



Università di Pisa

Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-Ambientali

Corso di Biosicurezza e Qualità degli Alimenti

Tesi di Laurea Sperimentale

in

**VALUTAZIONE IGIENICO SANITARIA DI
PRODOTTI ITTICI A BASE DI PESCE CRUDO
ACQUISITI SUL TERRITORIO TOSCANO PRESSO
ATTIVITÀ DI RISTORAZIONE ETNICA E
GRANDE DISTRIBUZIONE ORGANIZZATA**

Relatori:

Prof.ssa ALESSANDRA GUIDI

Dott. LORENZO CASTIGLIEGO

Correlatore:

Dott.ssa LAURA GASPERETTI

Laureanda:

GIULIA TRAMACERE

Anno Accademico 2014-2015

Indice

1.	Introduzione	1
1.1	La filiera ittica	2
1.2	Il rischio	4
1.3	Analisi del rischio.....	6
1.3.1	Valutazione del rischio.....	6
1.3.2	Gestione del rischio	7
1.3.3	Comunicazione del rischio	7
1.4	Il sistema RASFF (<i>Rapid Alert System for Food and Feed</i>)	8
1.5	Il principio di precauzione.....	9
1.6	Il sistema HACCP	10
1.7	Problematiche igienico sanitaria associate al comparto ittico	11
1.7.1	Numero di specie di interesse commerciale	11
1.7.2	Fisiologia degli organismi acquatici.....	12
1.7.3	Diversità dell'ambiente acquatico	13
1.7.4	Sistemi di pesca e allevamento.....	14
1.7.5	Gli illeciti del comparto ittico	15
1.8	Le malattie a trasmissione alimentare (MTA).....	19
1.9	La ristorazione collettiva	22
1.9.1	Il “crudismo” a tavola	23
1.9.2	Origine ed evoluzione del <i>sushi</i>	25
1.10	I pericoli microbiologici del <i>sushi</i>	26
1.10.1	<i>Anisakis</i>	27
1.10.2	Istamina	31
1.10.3	<i>Salmonella spp.</i>	34
1.10.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	35
1.10.5	<i>Escherichia coli</i> β -glucoronidasi positivi.....	36
1.10.6	Stafilococchi coagulasi positivi.....	37
1.10.7	<i>Vibrio cholerae</i> e <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	39
1.10.8	<i>Bacillus cereus</i>	41
2.	Scopo della tesi	42
3.	Materiali e Metodi	43
3.1	Individuazione dei punti vendita target.....	43

3.2	Controllo visivo per la presenza di larve di <i>Anisakis</i>	46
3.3	Determinazione della concentrazione di istamina	46
3.4	Analisi microbiologiche	48
3.4.1	<i>Salmonella spp.</i>	48
3.4.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	49
3.4.3	<i>Escherichia coli</i> β -glucoronidasi positivi.....	50
3.4.4	Stafilococchi coagulasi positivi.....	51
3.4.5	<i>Vibrio cholerae</i> e <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	52
3.4.6	<i>Bacillus cereus</i>	53
3.5	Conteggio delle colonie.....	54
4.	Risultati e Discussione	55
4.1	<i>Anisakis</i>	66
4.6	Istamina	66
4.3	<i>Salmonella spp</i>	67
4.4	<i>Listeria monocytogenes</i>	67
4.5	<i>Escherichia coli</i> β -glucoronidasi positivi.....	68
4.6	Stafilococchi coagulasi positivi.....	69
4.7	<i>Vibrio cholerae</i> e <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	69
4.8	<i>Bacillus cereus</i>	69
4.9	Osservazioni supplementari	70
5.	Conclusioni	75
	Bibliografia.....	76

Indice delle Figure e Tabelle

Figura 1 I dati relativi al 2009, 2010 e 2011 sono stime tratti da Fao, Food Outlook June 2011. Yearbook Fishery and Aquaculture Statistics 2008 [Ismea, 2011]	1
Figura 2 Composizione % delle importazioni extra- UE in volumi di prodotti allevati e pescati (2010). [EUMOFA, 2013].....	2
Figura 3 Esempi di errata (a) e corretta etichettatura (b)	16
Figura 4 Il <i>Fugu</i> è un piatto ricercato che per la sua pericolosità può essere preparato solo da cuochi dotati di una particolare licenza	19
Figura 5. Chiosco allestito in un supermercato	24
Figura 6 (a) <i>Nigiri</i> misto. (b) <i>Hosomaki</i> di salmone. (c) <i>Futomaki</i> . (d) <i>Uramaki</i>	26
Figura 7 Ciclo biologico di <i>Anisakis simplex</i>	28
Figura 8 Tessuto muscolare infestato da larve di <i>Anisakis</i>	29
Figura 9 Campagna di comunicazione del Ministero della Salute sul rischio parassitologico	31
Figura 10(a) Struttura chimica istidina (b) e istamina.....	32
Figura 11 La zona grigia indica la relazione tempo-temperatura associata alla produzione di istamina al di sotto del valore soglia di 100 ppm	33
Figura 12 <i>Salmonella spp.</i> (Gram stain).....	35
Figura 13 <i>Listeria monocytogenes</i> (Gram stain)	36
Figura 14 <i>Escherichia coli</i> (Gram stain).....	37
Figura 15 <i>Staphylococcus aureus</i> (Gram stain)	39
Figura 16 Vibrioni (Gram stain).....	40
Figura 17 <i>Bacillus cereus</i> (Gram stain).....	41
Figura 18 Esempio di una scheda di campionamento	44
Figura 19 Retta di taratura del kit RIDASCREEN Histamine.	47
Figura 20 Colonie di <i>Listeria monocytogenes</i> su ALOA	50
Figura 21 Colonie di coliformi (rosse) ed <i>Escherichia coli</i> (blu) su Petrifilm.....	51
Figura 22 Colonie di Stafilococchi coagulasi positivi su BP	52
Figura 23 Colonie di <i>Vibrio cholerae</i> (a) e <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (b) su TCBS e Chrom-Vibrio agar.....	53
Figura 24 Colonie di <i>Bacillus cereus</i> su MYP	54
Figura 25 Campione 35795/1 <i>Uramaki</i> salmone	68
Figura 26 Campione 75655 (a) <i>Nigiri</i> branzino. (b) <i>Nigiri</i> gambero.	68
Figura 27 Campione 40366 (a) <i>Hosomaki</i> salmone. (b) <i>Uramaki</i> surimi. (c) <i>Uramaki</i> salmone	69
Figura 28 Campione 35795 <i>Uramaki</i> tonno cotto.....	70
Figura 29 <i>Aeromonas spp.</i> gram stain.....	70
Tabella 1 Principali specie ittiche soggette a sostituzioni [Miller and Mariani, 2010]	17
Tabella 2 Elenco prove accreditate	45

Tabella 3 Prodotti a base di Sushi campionati presso esercizi commerciali delle province di Pisa, Firenze Livorno e Lucca	65
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

1.Introduzione

Nel 2011 la FAO ha stimato un consumo pro capite mondiale di prodotti ittici pari a 17,4 kg. Attualmente i prodotti della pesca forniscono il 15,7% delle proteine animali consumate dalla popolazione mondiale e il 6,1% delle proteine totali, divenendo la seconda fonte proteica nella dieta di un individuo dopo i prodotti carnei (Figura 1). [Ismea, 2011]

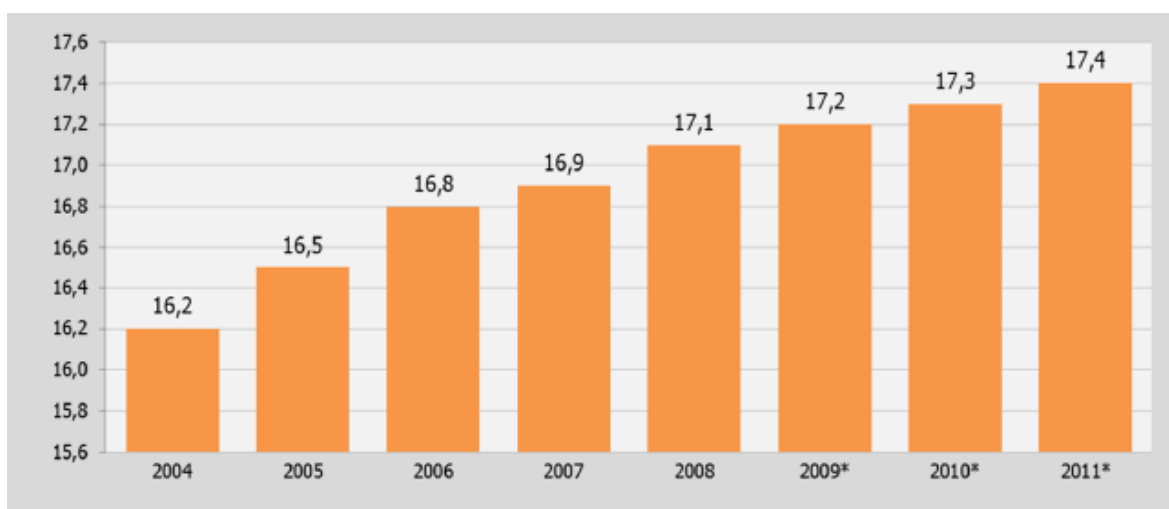


Figura 1 I dati relativi al 2009, 2010 e 2011 sono stime tratti da Fao, Food Outlook June 2011. Yearbook Fishery and Aquaculture Statistics 2008 [Ismea, 2011]

L'Allegato I del Regolamento (CE) n. 853/2004, ai punti 3.1.e 3.5, definisce:

Prodotti della pesca

“tutti gli animali marini o di acqua dolce (ad eccezione dei molluschi bivalvi vivi, echinodermi vivi, tunicati vivi e gasteropodi marini vivi e di tutti i mammiferi, rettili e rane), selvatici o di allevamento, e tutte le forme, parti e prodotti commestibili di tali animali”.

Prodotti della pesca freschi

“i prodotti non trasformati, interi o preparati, compresi i prodotti imballati sotto vuoto o in atmosfera modificata che, ai fini della conservazione non hanno subito alcun trattamento diverso dalla refrigerazione, inteso a garantirne la conservazione.”

Pertanto si considera trattamento una qualsiasi azione che ha provocato una modificazione sostanziale del prodotto iniziale, compresi trattamento termico, salagione, stagionatura, essiccazione, marinatura, estrazione, estrusione o una combinazione di tali alimenti.

1.1 La filiera ittica

In virtù delle enormi proprietà salutistiche che caratterizzano i prodotti ittici, tale tipologia di alimenti ha subito un'attenzione mediatica che ha portato ad un loro maggiore consumo, a un aumento della richiesta sul mercato e di conseguenza a un'intensificazione degli scambi internazionali e del commercio con l'Estero. [Colasanto, 2010]

I principali consumatori di prodotti della pesca sono i Giapponesi con 70 kg pro-capite all'anno di prodotto, contro i 21 kg pro-capite consumati dagli Italiani. [Colasanto, 2010]; mentre le specie ittiche maggiormente richieste dal mercato europeo sono soprattutto tonno, merluzzo, salmone, aringhe, cozze, nasello, gamberi e sgombero. [EU, 2014]

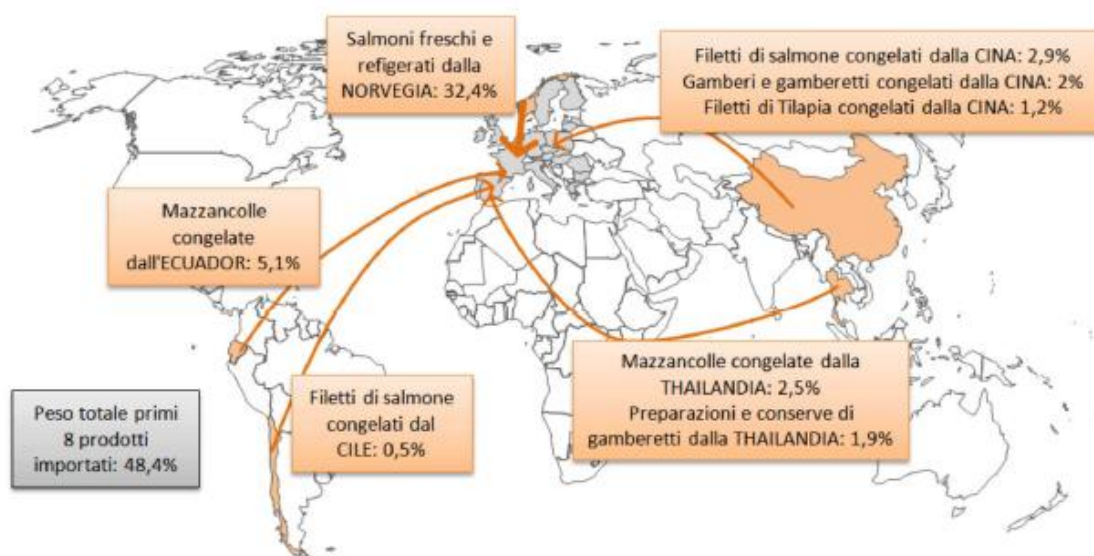


Figura 2 Composizione % delle importazioni extra- UE in volumi di prodotti allevati e pescati (2010).
[EUMOFA, 2013]

La richiesta è talmente elevata da parte dei consumatori che, nel 2011, gli Europei avrebbero esaurito il prodotto interno, se teoricamente calcolato in relazione al quantitativo di pescato annuo, prima del 2 Luglio e sono stati costretti, per i mesi successivi, a importare materia prima, principalmente dai Paesi del Sud-Est Asiatico. La maggior parte dei prodotti commercializzati a livello internazionale proviene, infatti, da Paesi non industrializzati, come la Cina. [FAO, 2010; Landi, 2010] L'elevata incidenza di malattie

gastro-enteriche e i livelli di sicurezza igienico-sanitaria discutibili di tali Paesi sono fondamentali da un punto di vista epidemiologico e, inevitabilmente, si riflettono in maniera negativa sulla qualità del prodotto che, di per sé, è già molto delicato e deperibile. [Toti, 2004]

Il recente sviluppo economico dei Paesi asiatici ha avuto ripercussioni non solo in ambito economico, ma anche sulla salute pubblica, poiché l'evoluzione economica di questi Paesi, purtroppo, non è sempre accompagnata da miglioramenti delle pratiche di produzione, che hanno lo scopo di garantire una qualità igienica sanitaria del prodotto. La parziale o totale assenza di controlli ispettivi in questi Paesi, comporta, quindi, la presenza di contaminanti con inevitabili ripercussioni sulla salute del consumatore. [Vizzani and Cenci Goga 2005]

Un ulteriore aspetto della globalizzazione, fondamentale per comprendere come essa influenzi non solo il business, ma anche lo stato epidemiologico di un Paese, è il continuo spostamento di popolazioni che portano con sé tradizioni, costumi e abitudini alimentari. In tale contesto si inserisce lo sviluppo esponenziale e la diffusione della ristorazione etnica, soprattutto cinese e giapponese, che attira sempre di più i consumatori europei. Tale tipologia di alimento sta diventando così popolare, che la sua produzione avviene anche in luoghi lontani da quelli d'origine; si evidenzia, però, una scarsa conoscenza sia della materia prima che delle tecniche di produzione. In Italia il fenomeno non è ancora ben radicato, non tanto per la ben consolidata tradizione gastronomica, conosciuta in tutto il mondo, ma probabilmente perché il numero di stranieri nel nostro Paese non raggiunge quello di altri Paesi membri, come Inghilterra, Francia e Germania. [Gianfaldoni and Guidi, 2008]

Quindi, si può affermare che la globalizzazione influenza la sicurezza alimentare su tre livelli:

- commerciale, in quanto, grazie alle nuove tecniche di conservazione e confezionamento, le merci possono percorrere anche lunghe distanze.
- culturale, perché lo spostamento di individui implica anche il trasferimento di abitudini alimentari, spesso causa di problemi di contaminazione e zoonosi.
- di costume, a causa dell'avvento di nuove tendenze alimentari (cucina giapponese).

L'affermarsi di un mercato globale ha inoltre portato all'esigenza di avere certezze sull'origine dei prodotti ittici, sulla loro tracciabilità, sulla qualità igienica, ma anche di avere sempre maggiori informazioni sulla loro qualità totale. La politica comunitaria è sempre più orientata verso una qualità dei prodotti legata all'ambiente e al territorio,

incoraggiando l'uso di pratiche ecocompatibili e responsabili. [Orban, 2007] L'aumentata consapevolezza da parte del consumatore nei confronti delle problematiche relative al comparto alimentare ha portato ad una crescente richiesta di prodotti sicuri, a garanzia della quale sono stati elaborati modelli di informazione sempre più avanzati. In questo contesto si inserisce un requisito fondamentale in materia di legislazione alimentare. L'articolo 18 del Regolamento (CE) n. 178/2002 fornisce una chiara definizione di:

Rintracciabilità

È disposta in tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione la rintracciabilità degli alimenti, dei mangimi, degli animali destinati alla produzione alimentare e di qualsiasi altra sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime. Gli operatori del settore alimentare e dei mangimi devono essere in grado di individuare chi abbia fornito loro un alimento, un mangime, un animale destinato alla produzione alimentare o qualsiasi sostanza destinata o atta a entrare a far parte di un alimento o di un mangime. A tal fine detti operatori devono disporre di sistemi e di procedure che consentano di mettere a disposizione delle autorità competenti, che le richiedano, le informazioni a riguardo.

L'Unione Europea, al fine di tutelare i diritti del consumatore, ha elaborato un sistema di prevenzione e controllo, in continuo aggiornamento, basato sull'analisi del rischio, la trasparenza informativa, il principio di precauzione, e strumenti di feedback, come il sistema RASFF e il sistema HACCP, che le consentono di mantenere uno dei più elevati livelli di sicurezza alimentare in tutto il mondo.

1.2 Il rischio

Il Regolamento (CE) n. 178/2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare, definisce:

Rischio

“funzione della probabilità e della gravità di un effetto nocivo per la salute, conseguente alla presenza di un pericolo” (Art. 3.9)

Pericolo

“Agente biologico, chimico o fisico contenuto in un alimento o mangime, o condizione in cui un alimento o un mangime si trova, in grado di provocare un effetto nocivo sulla salute” (Art. 3.14)

Quindi , un prodotto accettabile da un punto di vista igienico sanitario non deve essere:

- nocivo per la salute, con riferimento alla presenza di parassiti, germi patogeni, tossine, residui, ecc.;
 - deteriorato a causa di fattori microbiologici e fisico-chimici;
 - adulterato e, quindi, conforme a quanto dichiarato per contenuto e qualità.
- [Castellani,1998]

I principali pericoli, potenziali cause di Malattie a Trasmissione Alimentare, si classificano in:

- **BIOLOGICI**, come batteri, virus e parassiti. I batteri sono i principali contaminanti e, come enunciato precedentemente, si ritrovano in concentrazioni variabili in funzione della specie e dell’habitat in cui l’animale vive. [Toti, 2004; Giaccone, 2001]

I virus sono frequentemente associati al consumo di molluschi e bivalvi vivi che, in quanto organismi filtratori, possono rappresentare un vero e proprio serbatoio di contaminazione.

Infine, i parassiti causano malattie infestive responsabili di una forma morbosa che si manifesta a causa dell’ingestione di larve in seguito al consumo di pesce crudo, poco cotto o sottoposto a trattamenti non in grado di devitalizzare le larve. [Masotti et al., 2010]

- **CHIMICI**. Comprendono tutte le sostanze inquinanti, come i metalli pesanti, presenti nell’ambiente a causa dell’inquinamento atmosferico e che si riversano in mare attraverso le precipitazioni. Mentre il congelamento e la cottura sono tecniche in grado di ridurre a livelli accettabili il rischio associato alla presenza di patogeni, le medesime tecniche non sortiscono alcun effetto sui metalli pesanti.

A causa del fenomeno della biomagnificazione, si riscontra un accumulo di tali sostanze, negli organismi superiori, in funzione della taglia e della loro posizione nella catena trofica. Ad esempio, un pesce predatore, come il tonno, che occupa i

vertici della piramide alimentare, è maggiormente predisposto ad accumulare metalli pesanti e, se consumato in elevate quantità, può avere effetti negativi sull'uomo con patologie che interessano mucose, fegato, pancreas e reni.

È sbagliato, dunque, pensare che la contaminazione da metalli pesanti sia circoscritta alle preparazioni a base di pesce crudo, ma è relativa al consumo di grandi pesci predatori, indipendentemente dalla modalità di preparazione e consumazione.

- FISICI. Comprendono tutti i corpi estranei, come pezzi di vetro, di plastica o di metallo, che possono “contaminare” involontariamente il prodotto e causare lesioni più o meno gravi a seconda della dimensione e della tipologia. [MIPAAF, 2009]

1.3 Analisi del rischio

Il passo successivo della Comunità Europea, dopo aver dato una definizione del rischio, è stato ridurre il rischio, a livelli accettabili, in modo tale da garantire un elevato livello di tutela del consumatore. Il primo documento che cerca di standardizzare e raccogliere in un unico schema le diverse metodologie, proposte dagli organismi in materia di sicurezza alimentare, è “*Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment*”, pubblicato nel 1999 dal *Codex Alimentarius*. [CAC, 1999] Le istituzioni europee, riconoscendo l'importanza dei concetti di *risk analysis* e *risk assessment*, hanno deciso di introdurli anche nel Regolamento (CE) n. 178 /2002

L'analisi del rischio (*Risk Analysis*) è un processo sistematico, che prende in esame aspetti qualitativi e quantitativi, utilizza metodi probabilistici, allo scopo di caratterizzare la natura di un pericolo e la probabilità che esso sia causa di danni alla salute o possa venire in contatto con alimenti. [AA.VV. a cura di Colavita, 2008] È un processo costituito da tre fasi con competenze ben distinte [Reg (CE) n. 178/2002]:

- valutazione del rischio;
- gestione del rischio;
- comunicazione del rischio.

1.3.1 Valutazione del rischio

La valutazione del rischio (*Risk Assessment*) è un processo appannaggio della comunità scientifica che ha lo il compito di raccogliere dati qualitativi e quantitativi per una corretta stima del rischio. [AA.VV. a cura di Colavita, 2008] Consta di quattro differenti fasi:

- **INDIVIDUAZIONE DEL PERICOLO** (*hazard identification*) che stabilisce in maniera qualitativa la presenza e la natura del rischio. Ad esempio verificare che la presenza *Salmonella* in un alimento sia causa di Salmonellosi nell'uomo.
- **CARATTERIZZAZIONE DEL PERICOLO** (*hazard characterization*) che valuta in maniera qualitativa e quantitativa gli effetti avversi riconducibili all'esposizione del rischio. Ad esempio stabilire quanta *Salmonella* è presente nell'alimento e quanto di quell'alimento viene generalmente consumato.
- **VALUTAZIONE DELL'ESPOSIZIONE AL PERICOLO** (*exposure assessment*) che valuta qualitativamente e quantitativamente la probabilità di assunzione della fonte del rischio. Ad esempio, quanto di quell'alimento deve mangiare un individuo e quanta *Salmonella* deve essere presente perché si manifesti la malattia. Questa fase della valutazione del rischio è fortemente influenzata da fattori socio-economici, culturali, stagionali, individuali e comportamentali. [Käferstein F.K. *et al.*, 1997; AA.VV. a cura di Colavita G., 2008]
- **CARATTERIZZAZIONE DEL RISCHIO** (*risk characterization*) che esegue, basandosi sulle fasi precedenti, una stima qualitativa e quantitativa dell'effetto avverso sulla salute entro una certa popolazione. È il punto finale tramite il quale si definisce il rischio. [Reg. (CE) n. 178/2002]

1.3.2 Gestione del rischio

La fase di gestione del rischio (*Risk Management*), da quanto enunciato nel Regolamento (CE) n. 178/2002 “è un processo, distinto dalla valutazione del rischio, consistente nell'esaminare alternative d'intervento consultando le parti interessate (EFSA- European Food Safety Authority), tenendo conto della valutazione del rischio e di altri fattori pertinenti e, se necessario, compiendo adeguate scelte di prevenzione e di controllo”.

È una fase appannaggio delle Autorità che devono esaminare le eventuali misure di intervento da adoperare per prevenire o limitare i danni associati ad un rischio.

1.3.3 Comunicazione del rischio

La comunicazione del rischio (*Risk Communication*) è uno scambio interattivo di informazioni, raccolte durante il processo di analisi del rischio, riguardanti i rischi e gli elementi di pericolo tra responsabili della valutazione del rischio, responsabili della gestione del rischio, consumatori, imprese alimentari e mass media. [Reg (CE) n. 178/2002]

1.4 Il sistema RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*)

L'informazione tempestiva ai consumatori della probabilità di eventuali pericolo associati al consumo degli alimenti rappresenta un pilastro fondamentale inserito anche nel Regolamento (CE) n. 178/2002 secondo cui:

Informazione dei cittadini

“Fatte salve le pertinenti disposizioni comunitarie e degli Stati membri sull'accesso ai documenti, nel caso in cui vi siano ragionevoli motivi per sospettare che un alimento o mangime possa comportare un rischio per la salute umana o animale, in funzione della natura, della gravità e dell'entità del rischio le autorità pubbliche adottano provvedimenti opportuni per informare i cittadini della natura del rischio per la salute, identificando nel modo più esauriente l'alimento o mangime o il tipo di alimento o di mangime, il rischio che può comportare e le misure adottate o in procinto di essere adottate per prevenire, contenere o eliminare tale rischio.” (Art. 10)

Per tale motivo la Comunità Europea si avvale di uno strumento fondamentale per garantire il controllo transfrontaliero di informazioni e per reagire rapidamente quando vengono rilevati rischi per la salute pubblica, nella catena alimentare.

Il RASFF (sistema di allarme rapido per alimenti e mangimi) permette, attraverso lo scambio di informazioni su un portale consultabile online, il ritiro dal mercato dei prodotti che potrebbero rappresentare un pericolo per i consumatori. Dispone, inoltre, di una banca dati che permette l'accesso alle informazioni e le notifiche emesse in passato. Ad esempio, nel 2015 sono state emesse 32 notifiche per la presenza di microrganismi patogeni e 30 per biocontaminanti, in pesce e prodotti della pesca. [European Commission RASFF Portal <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=SearchForm&cleanSearch=1#>]

Le schede di notifica includono la natura e l'identificazione del pericolo, l'identificazione del prodotto e del lotto, l'origine e l'identificazione del produttore e distributore, le misure adottate e la distribuzione del prodotto, [Reg. (UE) n. 16/2011] in maniera tale da consentire di ricostruire il percorso del prodotto dalle prime fasi di produzione e poter, eventualmente, assegnare le giuste responsabilità.

1.5 Il principio di precauzione

Il principio di precauzione è un principio cautelativo che impedisce che un alimento sia destinato al consumo umano prima che siano stati raccolti dati sufficienti che garantiscano la sua innocuità nei confronti della salute del consumatore. Per cui l'Articolo 7 del Regolamento (CE) n. 178/2002 enuncia che:

Principio di precauzione

“Qualora, in circostanze specifiche a seguito di una valutazione delle informazioni disponibili, venga individuata la possibilità di effetti dannosi per la salute ma permanga una situazione d'incertezza sul piano scientifico, possono essere adottate le misure provvisorie di gestione del rischio necessarie per garantire il livello elevato di tutela della salute che la Comunità persegue, in attesa di ulteriori informazioni scientifiche per una valutazione più esauriente del rischio.”

A causa di tale principio e del desiderio di garantire un elevato grado di sicurezza, l'Unione Europea venne spesso accusata di eccessivo protezionismo da parte dei Paesi Terzi. Per tale motivo, nel 2000, la Commissione Europea è costretta ad emanare una decisione secondo cui *“una valutazione delle potenziali conseguenze dell'inazione e delle incertezze della valutazione scientifica dovrebbe essere compiuta dai responsabili al momento di decidere se intraprendere azioni basate sul principio di precauzione. Tutte le parti in causa dovrebbero essere coinvolte nel modo più completo possibile nello studio delle varie opzioni di gestione del rischio, una volta che i risultati della valutazione scientifica e/o della valutazione del rischio siano disponibili. La procedura dovrebbe essere quanto più possibile trasparente”*. Inoltre, nel caso in cui sia necessario applicare le misure basate sul principio di precauzione, esse devono essere:

- proporzionali rispetto al livello prescelto di protezione
- non discriminatorie nella loro applicazione
- coerenti con misure analoghe già adottate
- basate su un esame dei potenziali vantaggi e oneri dell'azione o dell'inazione (compresa, ove ciò sia possibile e adeguato, un'analisi economica costi/benefici)
- soggette a revisione, alla luce dei nuovi dati scientifici

- in grado di attribuire la responsabilità per la produzione delle prove scientifiche necessarie per una più completa valutazione del rischio. [Comunicazione della Commissione sul principio di precauzione, 2000]

1.6 Il sistema HACCP

Il sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*) è stato sviluppato negli anni '70 negli Stati Uniti con lo scopo di aumentare la produzione e allargare i mercati limitando le dispersioni di mezzi e risorse. Nel 1993 fu introdotto in Europa, con la direttiva 43/93/CEE (recepita in Italia con il decreto legislativo D.Lgs 155/97), e trovò applicazione nell'industria alimentare. Tale direttiva è stata poi sostituita dal Regolamento (CE) n. 853/2004.

L'HACCP è un sistema di autocontrollo che l'operatore del settore alimentare deve applicare, al fine di valutare e stimare i rischi e i pericoli e stabilire misure di controllo per prevenire l'insorgere di problemi igienico sanitari. Esso richiede 5 fasi preliminari, che hanno lo scopo di definire le risorse tecnologiche e umane a disposizione dell'azienda, specificano il prodotto e la linea produttiva. Le fasi sono:

- 1) FORMAZIONE DELL'HACCP TEAM, costituito da consulenti esterni e componenti dell'azienda stessa.
- 2) DESCRIZIONE DEL PRODOTTO O DELL'ATTIVITÀ con eventuali problemi annessi. La descrizione deve comprendere composizione, sistema di produzione e lavorazione, sistema di imballaggio e stoccaggio, durata di conservazione, condizioni di utilizzo e destinazione d'uso.
- 3) IDENTIFICAZIONE DELLA DESTINAZIONE D'USO O DELL'ATTIVITÀ specificando se la popolazione a cui ci si rivolge ha esigenze o problematiche particolari (celiachia, diabete, intolleranze, ecc.).
- 4) COSTRUZIONE DEL DIAGRAMMA DI FLUSSO che è una rappresentazione schematica di tutte le fasi che caratterizzano il ciclo di produzione.
- 5) VERIFICA IN CAMPO DEL DIAGRAMMA DI FLUSSO per accertarsi che non ci siano cross-contaminazioni o errori nel posizionamento di impianti e attrezzature.

Inoltre, i 7 principi, su cui si fonda l'HACCP, sono:

- a) INDIVIDUAZIONE DEI PERICOLI ED ANALISI DEL RISCHIO
- b) INDIVIDUAZIONE DEI PUNTI CRITICI DI CONTROLLO (CCP)
- c) DEFINIZIONE DEI LIMITI CRITICI
- d) DEFINIZIONE DELLE ATTIVITÀ DI MONITORAGGIO

- e) DEFINIZIONE DELLA AZIONI CORRETTIVE
- f) DEFINIZIONE DELLE ATTIVITÀ DI VERIFICA
- g) GESTIONE DELLA DOCUMENTAZIONE [Reg. (CE) n. 852/2004]

1.7 Problematiche igienico sanitaria associate al comparto ittico

Da queste premesse si deduce che il comparto ittico è uno dei più complessi e dinamici tra i settori alimentari e che la qualità finale di un prodotto della pesca è fortemente influenzata sia da fattori intrinseci (come il numero e le differenze fisiologiche tra le varie specie) sia da fattori estrinseci (l'ambiente di origine e i sistemi di pesca e allevamento). [Tiecco,2000; Toti, 2004; FAO, 2010]

1.7.1 Numero di specie di interesse commerciale

Nel 2011 l'ASFIS (*List of Species for Fishery Statistics Purposes*), database della FAO, ha calcolato l'esistenza di 11.562 specie commercializzate; nel 2014 il numero ha raggiunto la quota di 12.560 specie in commercio. In particolare l'Italia, nel 2014, esponeva sul proprio mercato 900 specie ittiche delle 1.200 presenti nel continente europeo. [Colasanto, 2010]

Inoltre, da non sottovalutare il fenomeno della tropicalizzazione, che favorisce l'arrivo di nuove specie ittiche, dapprima sconosciute. Il riscaldamento globale ha causato, infatti, un innalzamento della temperatura del Mar Mediterraneo che, ad oggi, rappresenta un bacino ideale per la sopravvivenza di pesci tropicali, provenienti principalmente dal Mar Rosso. L'elevata temperatura delle acque favorisce le specie aliene, che occupano gli spazi competitivi, a spese di quelle autoctone, la cui sopravvivenza è fortemente minata. [Ester, 1999]

Il canale di Suez, che collega il Mar Mediterraneo al Mar Rosso, non rappresenta, però, l'unico portale di entrata per questi organismi acquatici; infatti le imbarcazioni turistiche, le navi cisterna e le navi commerciali trasportano al loro interno un'infinità di specie animali e vegetali, le quali vengono riversate in mare attraverso lo scarico delle acque di zavorra. [Ester, 1999]

1.7.2 Fisiologia degli organismi acquatici

L'elevato numero delle specie ittiche di interesse commerciale non è sufficiente, però, a giustificare la complessità del settore dei prodotti della pesca.

Il tessuto muscolare degli animali, siano essi acquatici o terrestri, subisce variazioni nel *post-mortem* responsabili della consistenza, del gusto, del valore nutritivo e dell'evoluzione microbiologica del prodotto finale. [Toti, 2004]

La velocità del processo di “*spoilage*” del prodotto, inteso come l'insieme dei mutamenti microbici e chimici che determinano variazione dei caratteri sensoriali del prodotto fino ad un livello in cui l'alimento diviene inaccettabile per il consumatore, è fortemente influenzata da caratteristiche anatomiche e fisiologiche del tessuto stesso, come:

- la scarsa acidificazione del muscolo *post-mortem*. L'elevata deperibilità di tale tipologia di alimento è dovuta, in parte, al basso contenuto di carboidrati e quindi di glicogeno. Dopo la morte dell'animale, infatti, gli enzimi endogeni glicogenolitici e glicolitici sono temporaneamente attivi e scindono il glicogeno in unità di glucosio che, a sua volta, va incontro a glicolisi e viene convertito in piruvato, producendo adenosina trifosfato (ATP). Il piruvato, non potendo intraprendere la via della fosforilazione ossidativa, a causa della scarsità di ossigeno, viene trasformato in acido lattico.

L'ATP è responsabile della scissione dei legami tra i filamenti di actina e miosina che costituiscono il muscolo; una volta esaurito l'ATP, si instaura il *rigor mortis* o rigidità cadaverica. L'acido lattico, invece, provoca un abbassamento del pH fondamentale per ostacolare la proliferazione batterica. Purtroppo, la bassa concentrazione di glicogeno, nella maggior parte dei casi non permette di raggiungere un pH post-mortale in grado di inibire i fenomeni di deterioramento causati dall'attività microbica. In pesci cosiddetti a “carne rossa”, come il tonno, si raggiunge un pH finale pari a 5,4; mentre in pesci a “carne bianca” il pH si aggira intorno a 6-7. [Toti, 2004]

- l'elevata umidità delle carni. Normalmente, la concentrazione dell'acqua nei pesci magri si aggira intorno all'80%, mentre la percentuale nei pesci grassi è di poco inferiore. [Pagliarino, 2013]

L'elevata disponibilità di acqua nel tessuto muscolare favorisce la crescita dei batteri, che, in quanto organismi viventi, necessitano di acqua per far fronte al proprio metabolismo, crescere e moltiplicarsi.

- l'elevato contenuto di sostanze azotate non proteiche (ossido di trimetilammina, creatina e ammoniaca). La concentrazione di tali sostanze, nel tessuto muscolare del pesce, è da tre a cinque volte superiore rispetto a quello della carne. [Giaccone, 2001]

Questi composti, nel *post-mortem*, rappresentano una fonte nutritiva immediatamente disponibile per i microrganismi come *Photobacterium phosphoreum* e *Shewanella putrefaciens*. [Toti, 2004]

Gli enzimi di origine batterica metabolizzano tali molecole producendo sostanze a basso peso molecolare importanti sia sotto il profilo organolettico, in quanto conferiscono il tipico “odore di pesce”, sia dal punto di vista sanitario, poiché influenzano la conservabilità e l’edibilità del prodotto. [Giaccone, 2001]

Gli amminoacidi liberi, di cui il tessuto del pesce è particolarmente ricco, rappresentano un substrato ideale per la crescita di microrganismi (*Morganella*, *Photobacterium*, *Citrobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Proteus* ed *Enterobacter*) produttori di ammine biogene. [Kanki et al., 2004; Emborg et al., 2006; Ozogul and Ozogul, 2006; Dalgaard et al., 2008]

Un ulteriore esempio è rappresentato dalla trimetilammina (TMA), anch’essa prodotta da specifiche ossidasi batteriche a partire dal suo precursore, l’ossido di trimetilammina. Tale sostanza è sfruttata come indicatore di freschezza in funzione della sua concentrazione, per cui valori di:

- ✓ $TMA < \frac{5mg}{100g}$ indicano un prodotto fresco;
- ✓ $\frac{5mg}{100g} < TMA < \frac{20mg}{100g}$ indicano il principio di un’alterazione;
- ✓ $TMA > \frac{20mg}{100g}$ il prodotto è alterato. [James et al., 2009]

- la ridotta percentuale di tessuto connettivo che rappresenta una barriera fisica alla penetrazione e proliferazione dei batteri in profondità.

1.7.3 Diversità dell’ambiente acquatico

Gli organismi acquatici presentano una popolazione microbica saprofitaria che riflette la microflora dell’ambiente in cui esso vive. [Toti, 2004]

La cute, le branchie e il tratto gastro-enterico rappresentano le principali vie di penetrazione dei microrganismi. Mentre la microflora intestinale è, principalmente, influenzata dal tipo di alimentazione, i livelli di carica microbica di cute e branchie variano a seconda della temperatura. [Toti, 2004]

La temperatura dei pesci, e quindi il tipo e la concentrazione della popolazione microbica, è influenzata da aspetti come latitudine, profondità, correnti oceanografiche e sorgenti di acqua fredda. [EFSA Journal 2015] Per cui, ai pesci che vivono in acque fredde, dove la temperatura si aggira intorno ai 10-15°C, sono solitamente associate conte batteriche totali, a livello di pelle e branchie, di 10^2 - 10^4 UFC/g, con una popolazione maggiormente rappresentata da microrganismi gram positivi psicotrofi, come *Clostridium spp.*; al contrario, le concentrazioni batteriche superficiali, nei pesci tropicali, si aggirano intorno a 10^3 - 10^6 UFC/g, con una maggiore prevalenza di gram negativi meso-termofili, come *Moraxella*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium* e *Vibrio* marini. [Toti, 2004; Giaccone, 2001]

Tale diversità si riflette in maniera differente sulla conservabilità di un prodotto.

La conservazione degli alimenti si basa sull'impiego delle basse temperature, poiché l'attività dei microrganismi è fortemente rallentata a temperature prossime a 0°C. Infatti, tutte le reazioni metaboliche batteriche sono catalizzate da enzimi la cui velocità di reazione è direttamente proporzionale alla temperatura. Basti solo pensare che *Salmonella*, ad una temperatura di 10°C, si moltiplica in 10 ore, mentre a 15°C impiega solo 3 ore. [Ring, 1998]

Ne consegue che una specie ittica, caratterizzata da una contaminazione superficiale di origine psicotrofa, subirà meno l'effetto batteriostatico del freddo rispetto ad una specie che presenta una prevalenza di batteri meso-termofili. [James et al., 2009]

1.7.4 Sistemi di pesca e allevamento

Un ulteriore fattore che influenza la conservabilità del pescato è rappresentato dalle modalità e dalla professionalità nelle tecniche di cattura.

Mentre nell'industria delle carni gli animali vengono condotti al macello in buone condizioni fisiologiche e abbattuti con il minimo stress [Regolamento (CE) n. 1099/2009], le fasi di cattura del pesce prevedono diverse ore di lavoro, lontani dagli impianti di trattamento e trasformazione, che rendono difficoltoso il controllo degli animali al tempo della morte. [Toti L, 2004]

Ne consegue che il pesce subisce una lunga agonia durante la quale esaurisce le riserve di glicogeno con i problemi di acidificazione post-mortali correlati.

Le tecniche di pesca ricorrono, principalmente, a reti a strascico, larghe 90-100m e alte 9-10m con maglie quadrate di 10cm [Nishikawa et al., 2008], o reti da posta fissa disposte in direzione opposta alla corrente marina, all'interno delle quali le prede rimangono impigliate.[Kitamura and Omori, 2010] Le lesioni, lo schiacciamento, le lacerazioni e desquamazioni subite dagli animali a causa del trascinamento o dell'eccessiva permanenza in acqua espongono i tessuti all'attacco diretto dei batteri.

Al contrario, con l'acquacoltura, da cui deriva circa il 12% dei prodotti a livello mondiale, è possibile controllare l'intero ciclo di produzione di cui la principale variabile, che influenza la qualità del prodotto finale, è rappresentata dall'alimentazione. [Toti, 2004]

1.7.5 Gli illeciti del comparto ittico

Nonostante quanto enunciato, i pericoli associati al consumo di alimenti non sono unicamente legati alla presenza di contaminanti. Molto più spesso, è l'uomo stesso ad essere responsabile del danneggiamento fisico e morale del consumatore, in quanto principale attore, consapevole o inconsapevole, nello scenario relativo all'approvvigionamento e alla distribuzione dei prodotti ittici. Infatti, gli illeciti alimentari costituiscono un grave problema in quanto provocano ripercussioni in ambito socio-economico, sanitario e giuridico-culturale.

Le frodi dei prodotti della pesca sono al primo posto tra gli illeciti in ambito alimentare, a causa della deperibilità del prodotto, della scarsa conoscenza del consumatore medio nei riguardi delle numerose e diversificate specie ittiche e della crescente richiesta di mercato. [Del Bono and Renon, 2001] Infatti, molto spesso, i numerosi casi di illeciti alimentari sono conseguenza delle scelte dietetiche di alcuni Paesi che, tuttora, suggeriscono un elevato consumo di pesce a spese dell'ecosistema marino. [Clonan et al., 2012]

Generalmente, si tratta di frodi commerciali, a causa delle quali il consumatore viene danneggiato economicamente, in quanto paga un prodotto più di quanto effettivamente vale. [Del Bono and Renon, 2001]

Il compratore non esperto ignora le differenze morfologiche che intercorrono tra le numerose specie ittiche e le modalità di commercializzazione, in filetti o tranci, che modificano l'integrità anatomica, fanno perdere i riferimenti distintivi della specie, rendendo ancora più difficile una corretta identificazione ed etichettatura. [Manzoni et al.,

1998] Tuttavia, gli efficaci sistemi di tracciabilità, l’etichettatura e le tecniche molecolari rappresentano validi strumenti per contrastare il fenomeno delle frodi alimentari, fornendo maggiori garanzie sull’identità e l’origine dei prodotti commercializzati

L’articolo 35 del Regolamento (CE) n. 1379/2013, che integra il Regolamento (CE) n. 1169/2011 in materia di etichettatura dei prodotti della pesca e dell’acquacoltura, impone che nella vendita al dettaglio i prodotti ittici freschi e decongelati debbano riportare obbligatoriamente le seguenti indicazioni:

- DENOMINAZIONE COMMERCIALE DELLA SPECIE e il suo NOME SCIENTIFICO;
Es. Orata (*Sparus aurata*)
- METODO DI PRODUZIONE;
Es. Pescato (se pescato in mare), pescato in acque dolci o allevato
- ZONA DI CATTURA o STATO DI ORIGINE
- STATO FISICO;
Es. Decongelato o scongelato
- PRESENZA DI ADDITIVI
Es. Contiene solfiti

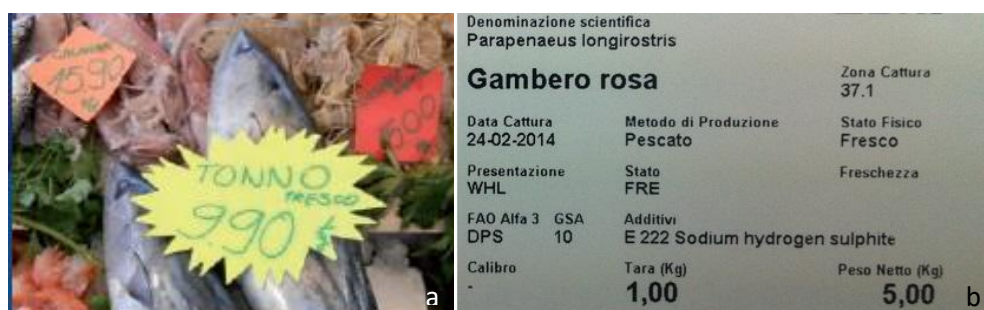


Figura 3 Esempi di errata (a) e corretta etichettatura (b)

Le frodi ingannano i consumatori creando una percezione distorta del vero stato dell’ambiente acquatico, mantenendo l’illusione di una continua disponibilità di specie ittiche molto richieste. [Miller and Mariani, 2010; Marko et al, 2004]

Ad esempio, a causa della continua richiesta di merluzzo bianco da parte del mercato, sono aumentati i casi di sostituzione con specie ittiche meno costose come il “pollock”. [Miller and Mariani, 2010]. Alcune delle frodi per sostituzione maggiormente riscontrate sul mercato sono riportate in Tabella 1.

SPECIE PREGIATA	SPECIE VENDUTA
GADIFORMI	
	Pesce nudo (<i>Gadus minutus capellanus</i>)
Nasello (<i>Merluccius merluccius</i>)	Melù (<i>Micromesistius poutassou</i>)
	Pastenula bianca (<i>Phycis blennoides</i>)
	Pastenula bruna (<i>Phycis phycis</i>)
PERCIFORMI	
Spigola (<i>Dicentrarchus labrax</i>)	Pesce serra (<i>Pomatomus saltatrix</i>)
Orata (<i>Sparus aurata</i>)	Salpa (<i>Salpa salpa</i>)
Triglia di scoglio (<i>Mullus surmuletus</i>)	Triglia di fango (<i>Mullus barbatus</i>)
PLEURONECIFORMI	
Sogliola (<i>Solea kleinii</i> , <i>Solea vulgaris</i> , <i>Solea lutea</i>)	Zanchetta (<i>Bothus podas</i> , <i>Arnoglossus laterna</i>)
ZEIFORMI	
Pesce San Pietro (<i>Zeus faber</i>)	Pesce tamburo (<i>Caprosaper</i>)
CLUPEIFORMI	
	Papalina (<i>Sprattus sprattus</i>)
	Alaccia (<i>Sardinella aurita</i>)
Sardina (<i>Sardina pilchardus</i>)	Alosa (<i>Alosa alosa</i>)
	Cheppia (<i>Alosa fallax nilotica</i>)

Tabella 1 Principali specie ittiche soggette a sostituzioni [Miller and Mariani, 2010]

Non è rara la sostituzione di trince di Palombo (*Mustelus sp*), Pesce spada (*Xiphias gladius*), Tonno (*Thunnus sp*, *Euthynnus pelamis*) e Storione (*Acipenser sturio*) con specie di minor valore commerciale, come Verdesca (*Prionace glauca*), Pesce elefante (*Cetorhinus maximus*), Pesce volpe (*Alopias vulpinus*), Smeriglio (*Lamna nasus*) e Gattuccio (*Shyliorhinus canicula*). [Del Bono and Renon , 2001]

La sostituzione assume importanza sanitaria quando sono coinvolte specie tossiche responsabili di pericolose e spesso mortali intossicazioni alimentari.

Negli USA, circa il 60% delle malattie associate al consumo di prodotti ittici sono causate da biotossine marine [Toti, 2004]; in Europa, dal 1991 al 2015, il RASFF ha emesso 7 notifiche per la presenza di biotossine algali o vendita di specie ittiche tossiche; l'ultima notifica, in particolare, risale al 2015 in Germania per vendita di filetti di pesce palla con il

nome di rana pescatrice. [https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/portal/?event=searchResultList]

Erroneamente, si potrebbe pensare che tali sostanze tossiche siano un prodotto del tessuto del pesce; in realtà, le biotossine sono sostanze prodotte da *phytoplanktos*, *phytoplankton* e batteri. [Toti, 2004] La diffusione di tali alghe è da imputarsi, principalmente, ad una maggiore pressione antropica, in quanto la loro proliferazione è più intensa nelle zone in cui la concentrazione di nutrienti (fosforo, azoto, silicati e vitamine) è maggiore, condizionata anche da fattori come temperatura, luce e composizione chimico-fisica dell'acqua. [Squarcione, 2007] Le biotossine rappresentano un problema per la salute pubblica, per la pesca, l'acquacoltura e per l'intero ecosistema marino. Possono essere genericamente raggruppate in quattro maggiori gruppi per tipologia sintomatologica: *Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP), la *Diarrhetic Shellfish Poisoning* (DSP), la *Neurotoxic Shellfish Poisoning* (NSP) e l'*Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP). L'intossicazione causata da tali sostanze è generalmente associata al consumo di pesce che si è nutrito di elevate quantità di *plancton* o di alghe tossigene. È importante tener presente che le biotossine algali sono resistenti al calore, non alterano le caratteristiche organolettiche del prodotto e la loro presenza non può essere rilevata attraverso le comuni analisi microbiologiche. [Toti, 2004]

Una tossina presente in oltre 400 specie di pesci tropicali è la ciguatossina, la quale ha una sintomatologia neurologica, gastrointestinale e cardiovascolare con esito raramente letale. Questa tossina si ritrova prevalentemente nei pesci pescati tra il 35° di latitudine nord e il 36° di latitudine sud, ma può arrivare sui nostri mercati attraverso l'importazione da paesi terzi [Tiecco, 2001].

Un cenno a parte lo merita la tetradotossina, sostanza prodotta da batteri, appartenenti ad esempio al genere *Vibrio*, responsabile di un'intossicazione associata al consumo di pesci appartenenti di *Tetraodontidae*, *Molidae*, *Diodontidae* e *Canthigasteridae*. La sostanza è 1200 volte più tossica del cianuro provoca nella vittima paralisi per il blocco della trasmissione del segnale nervoso, è altamente stabile al calore e non è in grado di passare la barriera emato-encefalica; per tale motivo il soggetto intossicato è perfettamente cosciente durante la comparsa dei sintomi. [Tepedino and Ferri, 2013]

La tetradotossina si accumula a livello di organi interni, come ovaia, testicolo e fegato, e può provocare morte se il pesce contaminato viene consumato intero. [Toti, 2004]

Infatti, nel 1977 sono stati registrati tre decessi per intossicazione alimentare da ingestione di pesce palla venduto con la denominazione di rana pescatrice (*Lophius piscatorius*).

[Tepedino and Ferri, 2013] Per queste ragioni, nella Sezione VIII dell'Allegato III del Reg. (CE) n. 853/2004, si vieta la vendita di specie appartenenti alle famiglie di *Tetraodontidae* (pesci palla), *Molidae* (pesci luna), *Diodontidae* (pesci riccio) e *Canthigasteridae* (pesci palla dal capo appuntito).

L'effetto tossico della tetradotossina rappresenta un problema sanitario in Giappone, poiché il pesce palla viene utilizzato per la preparazione di un piatto molto ricercato, conosciuto con il nome di *Fugu*. Proprio a causa della sua tossicità, richiede un'estrema competenza nel maneggiarlo e prepararlo, per cui, in Giappone, solo cuochi di comprovata esperienza possono utilizzare il *fugu* nelle cucine dei propri ristoranti. Si tratta di persone selezionate a cui è stata conferita una particolare licenza dal ministero di competenza. [Autilio, 2013]



Figura 4 Il *Fugu* è un piatto ricercato che per la sua pericolosità può essere preparato solo da cuochi dotati di una particolare licenza

1.8 Le malattie a trasmissione alimentare (MTA)

L'assunzione e/o la manipolazione di alimenti contaminati da microrganismi patogeni, tossine e/o metaboliti prodotti da microrganismi, parassiti e composti chimici pericolosi possono determinare la comparsa di malattie a trasmissione alimentare. [Zicari, 2001]

È necessario precisare che le condizioni socio-economiche, ambientali e sanitarie, in cui le popolazioni vivono, influenzano notevolmente la durata della vita e le cause di morte. Mentre nei Paesi industrializzati prevalgono le cosiddette “malattie del benessere”

(malattie cardiovascolari, tumori e diabete), associate alla sovralimentazione, all'inattività fisica e all'inquinamento, nei Paesi a basso reddito si registra una maggior prevalenza di malattie a trasmissione alimentare, responsabili della morte di 11.000 bambini all'anno. [Zicari, 2001; Dinucci e Pellegrini, 2010] In questi Paesi, tali malattie hanno un tasso di mortalità 30 volte superiore, a causa di fattori come la malnutrizione, la mancanza di acqua potabile, le scarse condizioni igieniche e l'arretratezza economica. [Zicari, 2001]

L'organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha stimato infatti che, nel 2012, 2.5 miliardi di persone non avevano ancora accesso ai migliori servizi igienici e che un miliardo di esse praticavano ancora la defecazione all'aperto. [WHO, 2014]

Paradossalmente, sebbene l'Europa e il Nord America abbiano una rete di sorveglianza epidemiologica più efficiente rispetto ai Paesi più arretrati, il numero di malattie trasmesse dagli alimenti, nei Paesi industrializzati, è in costante aumento. Le ragioni per cui tale fenomeno è in aumento nei Paesi più avanzati sono ascrivibili a:

- la possibilità di esportare ed importare gli alimenti nel mondo, che determina l'importazione anche di una serie di problemi di sicurezza igienico-sanitaria che si vanno ad aggiungere a quelli già presenti nel Paese di destinazione; [Zicari, 2001] inoltre, la presenza di 5-7 intermediari rendono il percorso, "dall'acqua al piatto", sempre più intricato e il controllo di tracciabilità e di qualità diviene difficile. [Stiles et al., 2011; Armani et al., 2012]
- la possibilità di effettuare spostamenti internazionali portando con sé anche i problemi sanitari del Paese di provenienza.
- l'indebolimento della popolazione causato dall'aumento dell'aspettativa di vita e dall'avvento di malattie che colpiscono il sistema immunitario, come l'AIDS. Infatti, gli anziani e gli individui immunocompromessi, a causa di un sistema immunitario indebolito, sono più suscettibili a contrarre malattie.
- i cambiamenti dello stile di vita che favoriscono l'insorgenza di problemi sanitari a causa dell'aumento del numero di pasti consumati "fuori casa" e della diffusione di nuove tendenze alimentari, come il crudismo. [Zicari, 2001]

In funzione dell'agente responsabile si possono distinguere tra malattie sostenute da microrganismi, avvelenamenti e infestazioni.

Le malattie causate da microrganismi possono essere suddivise in:

- **INFEZIONI.** Sono malattie sostenute da microrganismi patogeni, come virus e batteri, che si manifestano, generalmente, in seguito ad ingestione di alimenti contaminati. Tali patogeni esercitano la loro azione a livello della mucosa e sottomucosa intestinale danneggiando le cellule dell'organismo ospite. I virus maggiormente implicati in infezioni sono virus delle gastroenteriti (adenovirus e rotavirus), virus delle epatiti A ed E che si trasmettono attraverso la via oro-fecale ed enterovirus che presentano un quadro sintomatologico riconducibile alle malattie gastrointestinali. [AA.VV. a cura di Colavita, 2008]

Le infezioni sostenute da batteri possono, ulteriormente, classificarsi in:

- infezioni enteroinvasive che implicano la moltiplicazione del microrganismo all'interno dell'intestino e l'invasione della mucosa e della sottomucosa (*Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella spp.*).
 - infezioni enterotossiche che si verificano a causa della produzione, a livello intestinale, di tossine microbiche alle quali si attribuisce l'azione patogena (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e ceppi enterotossici ed enteroemorragici di *Escherichia coli*).
 - infezioni sistemiche che si manifestano quando i microrganismi superano le barriere intestinali e raggiungono tutti i distretti dell'organismo attraverso la circolazione sanguigna e linfatica (Brucelle, *Vibrio vulnificus* e *Aeromonas hydrophila*). [Tiecco, 2001]
- **INTOSSICAZIONI.** Si manifestano in seguito all'ingestione di ingenti quantità di tossine già presenti all'interno degli alimenti. In questo caso l'azione patogena è a carico esclusivo della tossina e non è contemplata la presenza del microrganismo che potrebbe essere stato inattivato, ad esempio, da trattamenti di cottura. Inoltre perché il microrganismo arrivi a produrre la tossina esso deve moltiplicarsi, nell'alimento, fino a raggiungere cariche microbiche elevate. [AA.VV. a cura di Colavita, 2008]

Le tossine sono definite **endotossine** quando fanno parte della membrana esterna dei gram negativi (lipopolisaccaride) e si liberano solo in seguito alla morte del microrganismo. Hanno effetti aspecifici (febbre, infiammazione, diarrea) e, a causa della loro natura non proteica, sono generalmente termostabili e non immunogene, ovvero non sono in grado di scatenare una risposta immunitaria. Le **esotossine** sono, invece, tossine di natura proteica, quindi immunogene, idrosolubili e termolabili. [Poli and Cocilovo, 2006]

- TOSSINFEZIONI IN SENSO STRETTO. Si verificano in seguito all'ingestione sia delle tossine sia dei microrganismi che le hanno prodotte; per cui l'azione patogena deriva dall'azione delle tossine e dei microrganismi che sopravvivono e continuano a moltiplicarsi nell'intestino. [AA.VV. a cura di Colavita, 2008]

Come anticipato precedentemente, i parassiti sono responsabili di INFESTAZIONI che, secondo l'FDA, causano il 5% dei ricoveri ospedalieri e il 21% dei decessi. Essi possono trasmettersi sia attraverso la via oro-fecale sia per via parenterale per poi diffondersi in tutto l'organismo per contiguità o mediante la circolazione sanguigna. La presenza dei parassiti determina, nell'ospite, fenomeni compressivi o occlusivi, reazioni allergiche, sottrazione di sostanze nutritive e produzione di sostanze tossiche. I principali parassiti, coinvolti nella contaminazione di alimenti, appartengono alla famiglia *Taeniidae* (*Taenia solium*, *Taenia saginata*) e *Anisakidae* (*Anisakis spp.*, *Pseudoterranova spp.*) [De Carneri, 2003; Urquhart, 2004]

Gli AVVELENAMENTI sono patologie causate dalla presenza di sostanze chimiche tossiche per la salute del consumatore. Tali elementi nocivi, talvolta, hanno derivazione ambientale (metalli pesanti, diossine, idrocarburi policiclici aromatici); altre volte sono residui di sostanze farmacologiche usate per scopi terapeutici o per pratiche fraudolente negli animali destinati al consumo umano. [Poli and Cocilovo, 2006]

1.9 La ristorazione collettiva

È stato dimostrato che, nei Paesi industrializzati, un terzo delle epidemie è registrato a livello della ristorazione pubblica, come ristoranti, bar, ecc., e a livello della ristorazione collettiva, che comprende mense ospedaliere e scolastiche. La maggior parte dei casi di malattia di origine animale sono causati da errori nelle tecniche di manipolazione, preparazione e stoccaggio degli alimenti. [Zicari, 2001; Borrello, 1998]

L'indagine epidemiologica è riuscita ad identificare le cause di episodi di malattia alimentare e tra le principali possiamo annoverare:

- cottura inadeguata;
- temperatura di stoccaggio inadeguata;
- contaminazione crociata con alimenti crudi;
- scarsa igiene personale degli operatori;

- contaminazione primaria del prodotto;
- eccessiva permanenza del prodotto tra cottura e consumo.

La contaminazione di un alimento può avvenire a diversi livelli della fase produttiva e, in funzione del momento, si distinguono in:

- PRIMARIE che avvengono a livello di materia prima a causa del suolo, dell'aria, dell'acqua o perché contaminata la materia prima stessa.
- SECONDARIE quando la contaminazione avviene durante le fasi di produzione, lavorazione e/o manipolazione.
- TERZIARIE avvengono a livello di stoccaggio, distribuzione e conservazione.
- QUATERNARIE riguardano il momento della distribuzione del prodotto al consumatore finale (ristorazione collettiva). [Tiecco, 2001]

Talvolta, però, è l'adeguamento del produttore alle esigenze del consumatore ad esporre la ristorazione collettiva a pericoli e causa ripetuti episodi tossinfettivi. [Castellani, 1998]

Il consumatore di oggi, infatti, pretende un prodotto che sia “fresco”, che abbia subito meno manipolazioni possibili e che abbia conservato tutte le caratteristiche organolettiche del prodotto di partenza. In questo contesto hanno trovato impiego le cosiddette *mild technologies*, ovvero tutte quelle tecnologie a ridotto impatto sensoriale sull'alimento. Tuttavia, tali tecnologie molto spesso non permettono di raggiungere un livello di sanificazione dell'alimento adeguato comportando rischi per la salute del consumatore. L'avvento delle *mild technologies* e le scorrette abitudini alimentari contribuiscono ad aumentare la frequenza e la consistenza degli episodi di malattie alimentari.

1.9.1 Il “crudismo” a tavola

È ormai noto che numerosi gruppi etnici, situati lungo le zone costiere dell'Asia (Bangladesh, Birmania, Cina, Giappone e Thailandia), sono soliti alimentarsi con prodotti ittici crudi. Tuttavia, si trova documentazione di preparazioni a base di pesce crudo anche nella tradizione italiana meridionale e insulare. [Del Bono and Renon, 2001]

Nel mondo occidentale, la diffusione del “crudismo” e di mode alimentari esotiche è da attribuire al rifiuto da parte del consumatore di cibi artefatti, colorati e aromatizzati, a favore, invece, di un prodotto “naturale”.

Nonostante il sushi rappresentasse, in passato, una prelibatezza di pochi ristoranti e fosse destinato ad un'élite di consumatori, è ormai difficile pensare che si tratti di una moda passeggera. La società odierna, costituita da consumatori sempre più sensibili ai temi della salute e in cerca di alimenti ipocalorici, ritrova nelle specialità nipponiche tutte le

caratteristiche ricercate e, grazie anche alla praticità di consumo, frequenta sempre più spesso fast-food, sushi bar e take-away, dove tali crudità vengono servite. [Landi, 2010; Nogara et al., 2004; Colasanto, 2010]

Persino la Grande Distribuzione Organizzata (GDO) ha risentito dell'elevata richiesta di prodotti etnici, al punto di esporre, tra i banchi frigo delle più note catene commerciali, prodotti tipici della tradizione gastronomica orientale. Il consumatore ha, quindi, la possibilità di poter acquistare sushi e sashimi preconfezionati e Ready To Eat. [Landi, 2010; Nogara et al., 2004; Colasanto, 2010; Masotti et al., 2010]



Figura 5. Chiosco allestito in un supermercato per la vendita di sushi RTE

Il crescente interesse nei confronti della cucina nipponica ha dato origine all'aumento numerico di punti di ristorazione *ex novo* o alla conversione dei ristoranti cinesi nei, più all'avanguardia, ristoranti giapponesi. Solo negli ultimi 10 anni, infatti, il numero di ristoranti etnici è aumentato del 72%, con i giapponesi al primo posto, immediatamente seguiti dai cinesi. [Landi, 2010]

Tuttavia, il passaggio da ristoranti cinesi a ristoranti giapponesi di sushi aumenta il rischio di infezioni a causa di pratiche di lavorazione da parte di mani inesperte. Un alimento come il sushi necessita di un'attenzione particolare durante tutte le fasi di preparazione e somministrazione. Per questo motivo, gli chef giapponesi hanno obbligatoriamente seguito corsi di formazione e sono in grado di pulire e sfilettare il pesce in modo professionale.

1.9.2 Origine ed evoluzione del *sushi*

Da un punto di vista etimologico, il termine “*sushi*” significa delizioso e, ad oggi, si riferisce ad una vasta gamma di prodotti a base di riso con l’aggiunta di altri ingredienti come pesce, alghe, vegetali o uova. [Horibe, 2003]

Le sue origini risalgono al IV secolo a.C. da una tecnica di conservazione, delle popolazioni del Sud Est asiatico, che prevede che il pesce, eviscerato e salato, sia posto sotto pressione in strati sovrapposti per qualche settimana. Trascorso il tempo necessario, il pesce viene dissalato in acqua e conservato all’interno di strati di riso bollito e freddo. Durante la maturazione del prodotto, la fermentazione degli zuccheri presenti nel riso provoca un aumento dell’acidità, in grado di contrastare la crescita batterica, determinando, quindi, il prolungamento della *shelf life* del prodotto. [Horibe, 2003]

Intorno al XVII secolo, il sushi, da metodo conservativo, si convertì in ricetta vera e propria adeguandosi ai gusti dei consumatori e arricchendosi di nuovi ingredienti, come aceto, verdure e salse. Il sushi che, ad oggi, trova apprezzamento in tutto il mondo, ha, quindi, origini recenti. A partire dai primi anni del XIX secolo assume la vera e propria connotazione di “*street food*”. Tra le strade di Tokio il metodo infallibile per riconoscere il miglior venditore di sushi consisteva nell’osservare un’apposita tenda bianca appesa vicino ad ogni banco; tale tenda era utilizzata dai consumatori per pulirsi dopo aver consumato il pasto per cui il suo grado di pulizia o sporcizia rappresentava un indicatore del numero di clienti e di conseguenza della qualità del prodotto. [Cedroni, 2001]

Le varianti di *sushi* più note e consumate comprendono:

- *NIGIRI*: piccoli filetti di pesce adagiati su una pallina di riso pressata a mano;
- *HOSOMAKI*: piccoli rotoli di riso rivestiti da alga nori e pesce all’interno;
- *FUTOMAKI*: rotoli di riso, più grandi degli *hosomaki*, rivestiti esternamente ed internamente da alga nori e con più ingredienti all’interno;
- *URAMAKI*: rotoli di riso e semi di sesamo rivestiti esternamente ed internamente da alga nori;



Figura 6 (a) *Nigiri misto*. (b) *Hosomaki di salmone*. (c) *Futomaki*. (d) *Uramaki*.

Gli ingredienti del sushi sono prodotti sia di origine vegetale sia di origine animale, per lo più crudi, che vengono lavorati il più rapidamente possibile dopo la raccolta per mantenerne intatto il sapore e la consistenza.

Tra i prodotti di origine vegetale ritroviamo:

- Riso: viene usata principalmente la varietà *japonica*, in quanto presenta il requisito fondamentale della coesione dei chicchi dopo cottura;
- Alga nori: l'alga più consumata a livello mondiale; è nota come lattuga di mare e deve la propria fama al *sushi*;

Altri ingredienti frequentemente utilizzati come avocado, sesamo e zenzero.

Gli ingredienti di origine animale sono:

- Pesce: come salmone (*sake*), tonno (*maguro*), anguilla (*unagi*) e halibut (*ohyou*). Altre specie utilizzate soprattutto in Italia, sono: pesce spada, spigola, sgombero e aringa.
- Crostacei: come gamberi (*ebi*), aragoste (*iseebi*) e gamberetti (*kurimaebi*),
- Molluschi: soprattutto polpo (*tako*). [Wikipedia, 2015; De Silva and Yamao, 2006]

1.10 I pericoli microbiologici del *sushi*

Nel 2013, l'8,5% delle tossinfezioni alimentari in Europa è stato causato da pesce e da prodotti della pesca; mentre il 7,3% delle tossinfezioni si sono verificate in seguito al consumo di molluschi e crostacei. [EFSA and ECDC, 2015]

In questo lavoro di ricerca sono stati ricercati gli indicatori microbiologici, che rappresentano le principali cause di malattie a trasmissione alimentare connesse al consumo di sushi. Sono stati, quindi, ricercati:

- Parassiti (*Anisakis*);
- Istamina;
- *Salmonella spp.*;
- *Listeria monocytogenes*;
- *Escherichia coli*;
- Stafilococchi coagulasi positivi;
- *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*;
- *Bacillus cereus*;

1.10.1 *Anisakis*

Le infezioni parassitarie legate al consumo di prodotti ittici rappresentano un grave problema di salute pubblica a livello mondiale. L'Organizzazione Mondiale della Sanità ha stimato una prevalenza di circa 60 milioni di casi e una popolazione esposta al rischio di infezione di circa 400 milioni. [Pozio, 2004]

L'*Anisakiasi* umana ha assunto un'importanza sanitaria ed economica in particolare in quei Paesi, come il Giappone, dove è diffusa l'abitudine di consumare pesci e cefalopodi crudi. In Italia, dove le abitudini alimentari non contemplano il consumo di elevate quantità di prodotti ittici crudi o poco cotti, la situazione è nettamente più favorevole; tuttavia, nel nostro Paese, sono state documentate decine di casi in seguito a endoscopia o esame istologico ed altri in seguito ad esame sierologico. Il numero dei casi, però, sembra essere sottostimato a causa dell'elevata prevalenza di infestazione nelle specie ittiche del Mar Mediterraneo e del comune consumo di pesce crudo da parte di alcune regioni d'Italia. [Audicana, 2002; De Carneri, 2003]

L'*anisakiasi* è una malattia parassitaria causata da nematodi appartenenti al genere *Anisakis* e *Pseudoterranova*. Gli agenti infestanti sono rappresentati, generalmente, dalle uova che scatenano la malattia a causa della non o insufficiente cottura o errata toelettatura del prodotto. [Toti, 2004]

Le larve di *Anisakis* completano il loro ciclo biologico all'interno di ospiti intermedi prima di raggiungere l'ospite definitivo. Il verme adulto risiede nello stomaco di mammiferi marini, dove le femmine di *Anisakis* producono uova non embrionate che sono emesse

nell'ambiente esterno con le feci. In acqua, l'embrione si sviluppa in larva del 1° stadio; con il passaggio al 2° stadio la larva esce dall'uovo e, una volta ingerita da un crostaceo planctonico, muta in larva di 3° stadio (L3). Di conseguenza, i pesci che ingeriscono questi crostacei si comportano da ospiti paratenici o di trasporto ed hanno un ruolo fondamentale per la diffusione della parassitosi.

Le larve al 3° stadio si localizzano nella cavità celomatica o a livello della superficie di organi come fegato e gonadi, dove tendono ad incistarsi e ad assumere la caratteristica forma a spirale dal diametro di 4-5 mm. Le forme infestanti completano il ciclo biologico quando tali pesci vengono ingeriti dai cetacei. [Pozio, 2004] Si deduce, quindi, che il passaggio da un livello trofico a quello successivo aumenta la probabilità che un pesce sia parassitato. [Pozio, 2004]

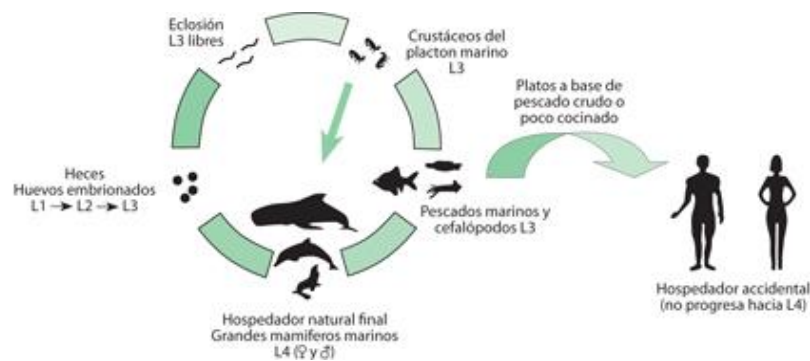


Figura 7 Ciclo biologico di *Anisakis simplex*

Per questo motivo, l'uomo rappresenta un ospite del tutto accidentale e contrae la malattia in seguito ad ingestione di un prodotto infestato.

Le larve si localizzano, generalmente, a livello intestinale, per cui non rappresentano un problema se il pesce viene eviscerato tempestivamente. Tuttavia, in presenza di un'infestazione massiva o un'eviscerazione tardiva le larve possono raggiungere il tessuto muscolare e contaminare l'intero prodotto. [Koie, 1995; Levsen and Lunestad, 2010]



Figura 8 Tessuto muscolare infestato da larve di *Anisakis*

Nell'uomo, l'anisakiasi può dare origine a una forma acuta o una cronica.

La forma acuta, a sua volta, si differenzia in:

- forma esofagea, che insorge dopo poche ore dal pasto e si presenta con disfagia, bruciore e reflusso gastro-esofageo;
- forma gastrica, che è la manifestazione più frequente con dolori all'epigastrio, nausea e vomito;
- forma intestinale, che presenta sintomi come nausea, vomito e diarrea.

Nelle forme acute è possibile, inoltre, registrare un'eosinofilia non particolarmente marcata dopo 24 h dall'esordio dei primi sintomi. [Takei and Powell, 2007]

La forma cronica evolve con lesioni granulomatose e ascessuali; la reazione flogistica può essere imponente e formare un infiltrato di eosinofili che determinano fenomeni occlusivi a livello delle ultime anse dell'ileo. I sintomi più frequenti sono difficoltà allo svuotamento gastrico, occlusione intestinale, versamento peritoneale, sintomatologia colitica e sangue occulto nelle feci. [Fazii, 2010]

Quando il parassita riesce a perforare la parete gastrointestinale e raggiungere gli organi limitrofi dà origine alle cosiddette forme ectopiche. [Fazii, 2010; Kobayashi et al., 1985; Yokogawa et al., 1967; Rushovich et al., 1983] In tal caso si parla di "sindrome da larva migrante" a causa della localizzazione a livello di mesenterio, pancreas, fegato, lingua, polmoni e gangli linfatici. [De Carneri, 2003]

Il Regolamento (UE) n. 1276/2011, che modifica l'Allegato III, sezione VIII, capitolo III del Regolamento (CE) n. 853/2004 relativamente al trattamento per l'uccisione dei parassiti vitali in prodotti della pesca destinati al consumo umano ed impone che:

Gli operatori del settore alimentare che immettono sul mercato i prodotti della pesca che vanno consumati:

- crudi o praticamente crudi;
- qualunque altro prodotto della pesca trattato, se il trattamento praticato non garantisce l'uccisione del parassita vivo,

devono assicurarsi che il materiale crudo o il prodotto finito siano sottoposti ad un trattamento di congelamento che deve consistere in un abbassamento della temperatura in ogni parte della massa del prodotto fino ad almeno:

- - 20 °C, per almeno 24
- - 35 °C, per almeno 15 ore.

Gli Operatori del Settore Alimentare (OSA) devono, inoltre, assicurare che i prodotti della pesca siano sottoposti ad un controllo visivo per la ricerca di endoparassiti visibili prima dell'immissione sul mercato e l'esclusione dal consumo umano dei prodotti della pesca manifestamente infestati.

La Decisione della Commissione 93/140/CE del 19 gennaio 1993, che fissa le modalità dei controllo visivo per l'individuazione dei parassiti nei prodotti ittici, definisce:

Parassita visibile

“un parassita, o un gruppo di parassiti, che per dimensione, colore o struttura è chiaramente distinguibile dal tessuto del pesce.”

Controllo visivo

“l'esame non distruttivo dei prodotti della pesca, condotto senza l'ausilio di mezzi di ingrandimento ottico e in condizioni di buona illuminazione per l'occhio umano e per pesci piatti e filetti anche mediante la speratura, ovvero l'osservazione del pesce controluce in una stanza buia.”

Tuttavia, al di là dei controlli assicurati dagli operatori del settore alimentare, è fondamentale operare una corretta profilassi, raccomandando di non consumare prodotti ittici crudi o poco cotti o che abbiano subito trattamenti inefficaci (salagione, affumicatura, marinatura, ecc.). [Pozio, 2004]



Figura 9 Campagna di comunicazione del Ministero della Salute sul rischio parassitologico

1.10.2 Istamina

Sebbene patogeni come *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio spp.*, *Aeromonas spp.*, batteri fecali e virus possano contaminare gli alimenti causando malattie nell'uomo, la maggior parte delle tossinfezioni è causata dalla formazione di ammine biogene, tra cui la più importante è l'istamina. [Huss et al., 2000; Dalgaard et al., 2006].

Nel 2014, il sistema di allerta RASFF ha inviato 33 notifiche per livelli elevati di istamina in prodotti della pesca. [RASFF annual report 2014]

Tale sostanza si ritrova normalmente in quantità ridotte all'interno di molti alimenti e bevande, ma è spesso responsabile di intossicazioni associate al consumo di prodotti della pesca, in particolare di pesci appartenenti alle famiglie *Scombridae*, *Scomberesocidae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*. [Huss et al., 2000; Dalgaard et al., 2006].

L'istamina deriva dalla trasformazione dell'amminoacido istidina, di cui il tessuto muscolare del pesce è particolarmente ricco [Ruiz-Capillas and Moral, 2004], ma essenziale, per la sua formazione, è la presenza di microrganismi dotati di specifiche istidin-decarbossilasi, in grado di operare la conversione dell'amminoacido in ammina biogena. [Ruiz-Capillas and Moral, 2004]

I principali microrganismi implicati in tale processo appartengono al genere *Morganella*, *Photobacterium*, *Citrobacter*, *Aeromonas*, *Klebsiella*, *Proteus ed Enterobacter*. [Kanki et al., 2004; Emborg et al., 2006; Ozogul and Ozogul, 2006; Dalgaard et al., 2008]

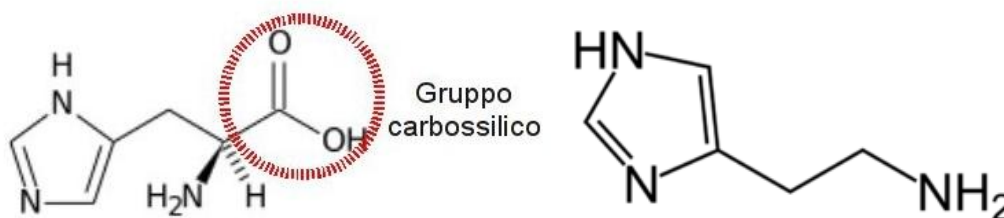


Figura 10(a) Struttura chimica istidina (b) e istamina

La maggior parte di questi microrganismi sono mesofili, ragion per cui le basse temperature sono efficaci per prevenire e rallentare la formazione di istamina. [James et al., 2009]

In figura 13 si valuta la formazione di istamina ad opera di uno dei principali microrganismi produttori di istamina (*Morganella psychrotolerans*).

Assumendo come concentrazioni iniziali di microrganismo 1000 CFU/g, di istidina 10750 ppm e di istamina 0 ppm, si può notare che per la durata di 10 giorni, se il prodotto viene conservato a temperature di refrigerazione (2°C), la concentrazione di istamina non supera le 100 ppm, valore soglia oltre cui si manifestano i sintomi più gravi dell'intossicazione. [EFSA Journal 2015]

Time (days)	Temperature (°C)							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Histamine formation (ppm)								
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	1	2	4
3	0	0	0	1	2	6	17	53
4	0	0	1	3	11	39	155	629
5	0	1	3	12	52	245	1 122	3 647
6	1	2	9	43	235	1 234	4 136	6 727
7	1	5	25	150	928	3 758	6 659	7 439
8	2	11	68	486	2 688	6 191	7 382	7 532
9	4	23	181	1 364	5 028	7 191	7 517	7 543
10	7	51	459	2 994	6 586	7 461	7 540	7 545
11	12	110	1 064	4 896	7 232	7 526	7 544	7 545
12	22	231	2 148	6 289	7 449	7 540	7 545	7 545
13	39	470	3 621	7 019	7 516	7 544	7 545	7 545
14	69	907	5 085	7 337	7 536	7 544	7 545	7 545

Figura 11 La zona grigia indica la relazione tempo-temperatura associata alla produzione di istamina al di sotto del valore soglia di 100 ppm

Tuttavia, l'istamina, una volta formata, è altamente stabile al calore e non può essere distrutta nemmeno da un trattamento drastico in autoclave (121°C a 103,4 KPa per 15-20 minuti). [EFSA Journal 2015]

I sintomi, che sopraggiungono dopo circa 60 minuti dall'ingestione, variano tra mal di testa, eruzioni cutanee, vomito, diarrea e formicolio degli arti e possono presentarsi in modo più o meno devastante a seconda della concentrazione e della suscettibilità del soggetto. Quando la concentrazione di istamina si aggira intorno a 5-10 ppm, l'intossicazione si manifesta con sintomatologia leggera, caratterizzata da arrossamenti cutanei, edemi e orticaria. Oltre le 100 ppm di sostanza l'intossicazione diventa più grave e si manifestano disturbi neurologici come cefalee e palpitazioni. [Dalgaard et al., 2006]

Il punto 1.25 dell'Allegato I del Regolamento (CE) n. 2073/2005 prevede che per un lotto di pesce, di cui si devono analizzare nove campioni:

- il tenore medio non deve superare i 100 ppm;
- due campioni possono avere un tenore compreso tra 100 e 200ppm;
- nessuno deve superare i 200ppm.

La rilevazione di istamina avviene mediante un valido metodo di screening rappresentato dal test ELISA. È un metodo analitico che sfrutta la reazione altamente specifica tra antigene e anticorpo e permette di analizzare più campioni contemporaneamente; dà risultati in tempi brevi e con una spesa contenuta. Tuttavia, il test può essere usato unicamente come metodo di screening, in quanto, secondo i punti 1.25 e 1.26 dell'Allegato I del Regolamento (CE) n. 2073/2005, la conferma dei risultati è fornita unicamente dall'HPLC (cromatografia liquida ad elevate prestazioni).

1.10.3 *Salmonella* spp.

Il genere *Salmonella* comprende microrganismi ubiquitari gram negativi, bastoncellari, anaerobi facoltativi. Sono germi termolabili inattivati dal processo di pastorizzazione o dalla semplice cottura dell'alimento. [Del Bono and Renon, 2001]

Nel 2009 Germania, Italia e Spagna, hanno segnalato campioni positivi per *Salmonella* in pesce e prodotti della pesca, anche se ad un livello molto basso. L'Italia in particolare, ha registrato 6 positività (8,2%) su 73 campioni analizzati tutti di provenienza non specificata. [Tolli et al., 2012]

Nell'uomo, la Salmonellosi ha carattere entero-invasivo non tossigeno e, perché si realizzi, è necessaria un'elevata carica batterica. La sintomatologia si manifesta con vomito, diarrea e dolori addominali, ma in soggetti immunocompetenti tende a risolversi in 1-2 giorni. [Del Bono and Renon, 2001]

Sebbene i prodotti maggiormente incriminati per contaminazione da *Salmonella* includano uova, prodotti a base di uova, carne avicola e carne rossa, sono stati ritrovati sierotipi di *Salmonella*, come *Salmonella enterica* Weltevreden, all'interno della microflora intestinale di pesci allevati in acquacoltura. [EFSA Journal 2015]

In Giappone, questi microrganismi erano presenti con una prevalenza del 22% nelle anguille [Saheki et al., 1989]; nel Nord-America sono stati ritrovati, invece, in allevamenti di pesce-gatto [Wyatt et al., 1979] e gamberi. [Reilly and Twiddy, 1992] Tuttavia, tale biotipo non causa, generalmente, salmonellosi nell'uomo.

I prodotti della pesca possono essere causa di tossinfezioni sostenute da *Salmonella* per contaminazione delle acque con acque reflue, per manipolazione, lavorazione e conservazione degli alimenti in scarse condizioni igieniche. Per tale motivo un prodotto come il sushi, che non subisce un trattamento termico, può essere contaminato da *Salmonella*.

L'unico modo per limitare la tossinfezione è rappresentato dalla prevenzione che comprende accortezze come rispetto della catena del freddo, separazione di alimenti cotti e crudi, pulizia e disinfezione, igiene degli operatori che manipolano il cibo. [Del Bono and Renon, 2001]



Figura 12 *Salmonella* spp. (Gram stain)

1.10.4 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes è un microrganismo gram positivo, anaerobio facoltativo e responsabile di una tossinfezione “emergente” che attira sempre di più l’attenzione degli igienisti alimentari.

Caratteristica da non sottovalutare è la sua capacità di moltiplicarsi in un ampio intervallo di temperatura (3-45°C), sebbene la sua vitalità si riduca notevolmente in prossimità delle temperature di pastorizzazione e intorno a 0°C. Nonostante sia in grado di liberare metaboliti tossici, tra cui un’emolisina, la tossinfezione è strettamente legata alla presenza del germe e non si può parlare di intossicazione. Raramente *Listeria monocytogenes* è stata rilevata al di sopra dei limiti di sicurezza legale, ma può rappresentare un pericolo per anziani, soggetti immunocompromessi e donne in gravidanza. [Del Bono and Renon, 2001]

Il microrganismo è un contaminante ambientale ed è stato frequentemente ritrovato in impianti di trasformazione del pesce, motivo per il quale il sushi rappresenta un potenziale veicolo di tossinfezione. [Tolli et al., 2012]

L’allegato I del Reg. (CE) 2073/2005 e s.m., nei punti 1.2 e 1.3, fa riferimento a due tipologie di prodotti; all’interno degli alimenti che costituiscono un terreno favorevole per la crescita di *Listeria monocytogenes* il germe deve essere assente in 25g di prodotto.

Mentre quelli che non costituiscono terreno favorevole alla crescita del microrganismo possono tollerare fino a 100 UFC/g.

I terreni che non favoriscono la crescita di *Listeria monocytogenes* sono quelli con $pH \leq 4,4$, $a_w \leq 0,92$, con $pH \leq 5,0$ e $a_w \leq 0,94$ ed infine i prodotti con un periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni. [Regolamento (CE) n. 2073/2005]

Nel 2009 raramente i prodotti Ready To Eat sono risultati non conformi al criterio del Reg. (CE) n. 2073/2005, anche se durante il processo di lavorazione, una maggiore proporzione di prodotti RTE non soddisfaceva il criterio di assenza di *Listeria monocytogenes*. I più alti livelli di non conformità al dettaglio sono stati trovati nei prodotti della pesca RTE (1%), nei formaggi (1,1%) e in prodotti a base di carne (0,3%). [Tolli et al., 2012]

Nel 2013, invece, il 4,6% di campioni individuali di salmone affumicato e il 19,9% dei lotti, sono stati riscontrati non conformi relativamente ai criteri definiti dall'Allegato I del Regolamento (CE) n. 2073/2005 [EFSA and EDCC, 2015].

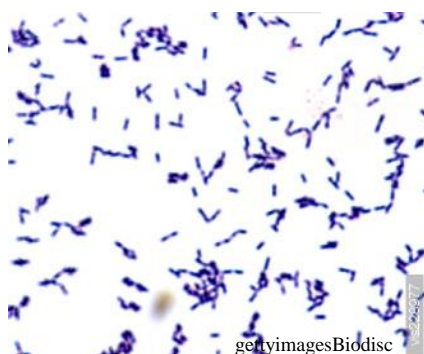


Figura13 *Listeria monocytogenes* (Gram stain)

1.10.5 *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi

Escherichia coli è un microrganismo gram negativo, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* come *Salmonella*; ha forma bastoncellare, è anaerobio facoltativo, metabolizza il lattosio, è dotato dell'enzima glucuronidasi ed è in grado di crescere anche a temperature pari a 44°C. [Andreis and Ottaviani F., 2002]

Per molto tempo, questo microrganismo, abitualmente presente come saprofita nell'apparato digerente di uomo e animali a sangue caldo, è stato considerato un ottimo indicatore di scarsa igiene e di contaminazione fecale nelle diverse industrie alimentari. Successivamente, se ne comprese l'importanza anche come agente tossinfettivo a seguito di focolai verificatisi per consumo di alimenti di origine animale e vegetale, acque

comprese. [Del Bono and Renon, 2001] Infatti, esistono ceppi in grado di produrre tossine o di infettare gli enterociti, causando scompensi transitori a livello intestinale. Se si escludono i sierotipi verocitotossici, i quali possono indurre conseguenze anche gravi a livello di altri siti corporei, come, ad esempio, i reni, la sintomatologia più comune dei ceppi patogeni è riconducibile a vomito, diarrea, nausea e dolori addominali. [Del Bono and Renon, 2001]

Il Reg. (CE) n. 2073/2005 e s.m., allegato I, capitolo 2, punto 2.4.1, prevede il conteggio degli *Escherichia coli* su 5 unità campionarie alla fine del processo di lavorazione. Il prodotto è soddisfacente se i valori sono pari o inferiori a 1 UFC/g; accettabile se due campioni su cinque presentano valori tra 1 e 10 UFC/g; infine il prodotto è insoddisfacente se la conta batterica è superiore a 10 UFC/g. La ricerca di *Escherichia coli* contemplata dal suddetto regolamento viene imposta non tanto per il fatto che tale specie rappresenti direttamente un problema di sicurezza alimentare, ma piuttosto perché costituisce un indice di scarse condizioni igieniche. Infatti, qualora dovesse essere presente in elevate concentrazioni, si renderebbe necessario apportare miglioramenti nelle fasi di produzione, lavorazione o manipolazione.

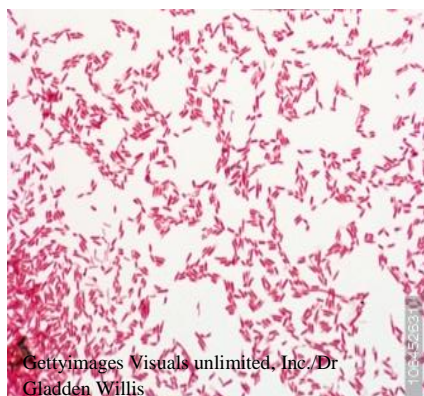


Figura 14 *Escherichia coli* (Gram stain)

1.10.6 Stafilococchi coagulasi positivi

Gli Stafilococchi sono germi gram positivi, di forma sferica (cocchi), anaerobi facoltativi e alofili tolleranti.

Sono state identificate più di 20 specie, ma la più virulenta e implicata in Malattie a Trasmissione Alimentare è *Staphylococcus aureus*. [Del Bono and Renon, 2001]

La contaminazione dei prodotti della pesca spesso è il risultato di una cross-contaminazione da parte degli operatori che manipolano il cibo. [EFSA Journal 2015]

Uno studio del 2012 ha riportato un'incidenza del 27% nel pesce essiccato e salato, del 26% nel pesce affumicato, del 25% nei prodotti precotti, 20% in surimi non congelato, 17% nelle uova di pesce e il 10% in prodotti *Ready To Eat*. [Vazquez-Sanchez et al., 2012]

L'infezione stafilococcica, a differenza di quella provocata da *Salmonella* (tossinfezione) è un'intossicazione da enterotossina, nota come “intossicazione stafilococcica”, legata alla produzione di metaboliti, come enterotossine (A, B, C₁, C₂, C₃, D ed E). [Del Bono and Renon, 2001]

Le enterotossine sono esotossine in grado di alterare l'equilibrio ionico di membrana delle cellule intestinali. Esse agiscono a livello dell'AMP ciclico promuovendo il movimento di ioni dall'interno della cellula verso l'esterno; ciò determina un aumento della pressione osmotica che causa un richiamo di acqua nel lume intestinale. Si verifica, quindi, aumento del volume delle feci, intensificazione della peristalsi con conseguente scarica diarroica. [James, 2009]

Il germe è piuttosto sensibile al calore, ma le enterotossine sono resistenti anche alle temperature di pastorizzazione, cottura e all'acidificazione. [Andreis and Ottaviani, 2002]

La sintomatologia si manifesta in un breve arco di tempo (1-4h) con nausea, cefalea e dolori addominali.

Gli stafilococchi sono microrganismi ubiquitari, per cui gli alimenti maggiormente incriminati sono quelli manipolati, la cui lavorazione e preparazione può causare contaminazioni anche dopo la cottura, specialmente nella ristorazione collettiva.

La prevenzione è incentrata, quindi, sulle buone norme igieniche, sul mantenimento della catena del freddo e sulla separazione di cibi cotti e crudi. [Del Bono and Renon, 2001]

Anche gli Stafilococchi, come *Escherichia coli*, sono considerati indicatori di igiene di processo e la loro concentrazione viene monitorata al fine di non superare le 10⁵ UFC/g, valore soglia a cui producono la tossina.

Il Reg. (CE) n. 2073/2005 e s.m., allegato I, capitolo 2, punto 2.4.1, prevede il conteggio degli Stafilococchi coagulasi positivi su 5 unità campionarie alla fine del processo di lavorazione. Il prodotto è soddisfacente se i valori sono pari o inferiori a 100 UFC/g; accettabile se due campioni su cinque presentano valori tra 100 e 1000 UFC/g; infine il prodotto è insoddisfacente se la conta batterica è superiore a 1000 UFC/g.

Anche in questo caso un'elevata carica microbica è indice di un necessario miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie nelle fasi di produzione.

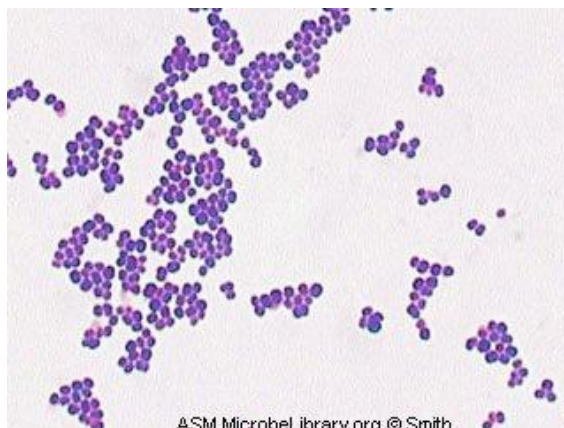


Figura15 *Staphylococcus aureus* (Gram stain)

1.10.7 *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*

In passato, batteri autoctoni dell'ambiente marino sono stati responsabili del 20% delle malattie a trasmissione alimentare e del 99% degli eventi fatali legati al loro consumo. [Lipp and Rose, 1997] Soltanto a partire dagli anni '50, grazie all'uso di opportune tecniche per il trattamento delle acque di scarico e all'attività di controllo delle acque destinate all'allevamento, la frequenza di tali malattie è notevolmente diminuita.

I principali microrganismi responsabili di gastroenteriti, in seguito al consumo di prodotti ittici crudi o poco cotti, sono i Vibrioni, microrganismi gram negativi, di forma ricurva e mobili. Hanno un metabolismo ossidativo e fermentativo e a seconda della specie presa in esame tollerano concentrazioni variabili di sale. [Murray, 1995]

Da uno studio condotto per la salvaguardia del Mar Adriatico, presso l'Istituto di Sanità, è emerso che su 726 ceppi isolati da molluschi, il 46,9% apparteneva al genere *Vibrio*. Inoltre si notò che il microrganismo era presente nell'ambiente con un andamento stagionale. [Croci et al., 2001] Si riscontrava un'elevata frequenza del germe in estate, in associazione all'aumento dei casi di tossinfezione, e una tendenza a diminuire nel periodo invernale

I fattori che influiscono maggiormente sulla vitalità dei Vibrioni sono la temperatura e la salinità dell'acqua. Le condizioni ottimali per la loro crescita prevedono temperature tra 10-30°C e percentuali di sale tra il 5-30% a seconda della specie. [Cozzi and Ciccaglioni, 2004]

La specie *Vibrio cholerae* riveste notevole importanza, perché causa di malattia che richiede la quarantena e denuncia all'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS).

Altre specie, come *Vibrio parahaemolyticus*, sono responsabili di tossinfezioni. [West, 1989; Oliver et al., 1997]

La malattia alimentare acuta da *Vibrio parahaemolyticus*, nella forma di una grave gastroenterite, fu segnalata per la prima volta in Giappone nel 1951. Dopo tale data gli episodi registrati divennero assai numerosi soprattutto in Estremo Oriente e nel Sud Est Asiatico, dove il consumo di pesce, molluschi e crostacei crudi rappresenta un'abitudine alimentare.

La malattia indotta da tale patogeno è associata ad un'elevata dose infettante, per cui si manifesta con una carica microbica superiore a 10^6 [Liston, 1980] e con una sintomatologia che ha inizio dopo 6-20 ore dall'ingestione dell'alimento con vomito diarrea e dolori addominali. [Del Bono and Renon, 2001]

È opportuno precisare che nei soggetti sani gli effetti patogeni di *Vibrio parahaemolyticus* sono indubbiamente poco frequenti; al contrario in soggetti con disordini epatici la suscettibilità a contrarre la malattia è 80 volte superiore e i casi di morte rispetto agli individui sani sono in rapporto 200:1. [Del Bono and Renon, 2001]

La prevenzione è incentrata sulla cottura e il mantenimento della catena del freddo nelle fasi di stoccaggio e commercializzazione.



Figura 16 Vibrioni (Gram stain)

1.10.8 *Bacillus cereus*

Bacillus cereus è un bacillo gram positivo, sporigeno e aerobio facoltativo.

In passato, era causa di Malattie a Trasmissione Alimentare molto frequenti, soprattutto in Medio Oriente, ma, tuttora, i fenomeni sono presenti anche in Italia e in numerosi Paesi Europei. [Zicari, 2001]

La sua moltiplicazione ottimale avviene alla temperatura di 37°C, ma il germe è caratterizzato da psicrotrofia, per cui ha la capacità di moltiplicarsi, seppur lentamente, a temperature prossime alla refrigerazione.

Si ritrova frequentemente in alimenti di origine vegetale e in alimenti ricchi in amido, come il riso, ingrediente base della cucina giapponese. [Del Bono and Renon, 2001]

L'intossicazione può manifestarsi con due quadri distinti ascrivibili a due tossine differenti:

- la sindrome emetica che insorge dopo 1-5 ore con nausea e vomito;
- la sindrome diarrogena che si manifesta dopo 8-16 ore con dolori addominali e diarrea.

È opportuno ricordare che, mentre la forma vegetativa del microrganismo può essere inattivata con la pastorizzazione, le spore di *Bacillus cereus* sono in grado di resistere alle alte temperature. [Andreis and Ottaviani, 2002]

In alcuni rari casi gli alimenti potrebbero risultare contaminati da *Bacillus cereus*, a causa di un trattamento termico inadeguato.

Nel 2007 è stata, infatti, registrata una tossinfezione da *Bacillus cereus* in seguito a consumo di tonno cotto in maniera impropria. [Domenech-Sanchez et al., 2011]

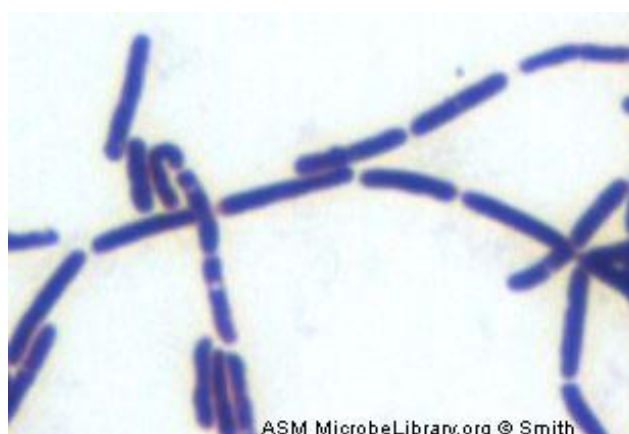


Figura17 *Bacillus cereus* (Gram stain)

2. Scopo della tesi

La tesi si inserisce all'interno di un progetto di ricerca più ampio, che si prefigge di valutare la qualità igienico-sanitaria e commerciale dei prodotti ittici destinati alla ristorazione scolastica, ospedaliera ed etnica, in modo da permettere lo sviluppo di nuovi programmi per il rafforzamento del controllo nel settore dei prodotti della pesca.

Le analisi microbiologiche e biotossicologiche di questo lavoro di ricerca hanno preso in esame i prodotti ittici a base di pesce crudo prelevati da punti di ristorazione o dalla Grande Distribuzione Organizzata presenti sul territorio toscano allo scopo di verificare la conformità ai criteri di igiene di processo e sicurezza alimentare previsti dalla normativa in materia di prodotti ittici.

3. Materiali e Metodi

3.1 Individuazione dei punti vendita target

La consultazione delle liste dell'anagrafica delle ASL delle zone interessate e una ricerca sul web hanno permesso di individuare 22 attività di ristorazione etnica distribuite sui territori della Provincia di Pisa, Firenze, Livorno e Lucca.

Tutti gli esercizi sono stati contattati telefonicamente per verificare che fossero ancora operanti.

Il campionamento ha coinvolto 21 esercizi di ristorazione con il prelievo di un numero variabile di prodotti a base di pesce crudo (3-8); I titolari di tali esercizi non erano a conoscenza del lavoro di ricerca che stava avvenendo e, quindi, delle ragioni del prelievo, che è stato effettuato nella forma di una comune ordinazione da asporto, in maniera tale che questi non potessero influenzare, inconsapevolmente o meno, le analisi successive.

L'indagine ha focalizzato il target di campionamento su quelle preparazioni maggiormente richieste dal consumatore e in totale, sono stati raccolti 86 campioni, costituiti da 30 *hosomaki*, 40 *nigiri* e 16 *uramaki*, trasportati in condizioni di refrigerazione presso il laboratorio di microbiologia degli alimenti dell'Istituto Zooprofilattico del Lazio e della Toscana (Sezione di Pisa) e accompagnati da apposito verbale con le generalità dell'attività, la temperatura al momento del prelievo e gli ingredienti dei campioni in esame (Figura 18).

Ricerca corrente [REDACTED]

Valutazione della qualità igienico sanitaria e commerciale dei prodotti ittici destinati alla ristorazione scolastica, ospedaliera ed etnica

Campionamento n. 28

Luogo di prelievo [REDACTED]

Data e ora del prelievo: ^{CG} 07-05-15 ore 19:30

Campioni prelevati da: [REDACTED]

Confezione 1:
 Denominazione di vendita: "Nighiri ORATA"
 Modalità di conservazione presso il punto vendita/struttura di ristorazione: **preparato al momento cucina non a vista**
 Modalità di presentazione (sfuso/preconfezionato) sfuso
 Lista ingredienti (come da etichettatura se presente o dati raccolti nel punto vendita): **orata, riso, olio vegetale**
 Data di preparazione: 06-05-15 Data di scadenza

Confezione 2:
 Denominazione di vendita: "nighiri tonno"
 Modalità di conservazione presso il punto vendita/struttura di ristorazione: **preparato al momento cucina non a vista**
 Modalità di presentazione (sfuso/preconfezionato) sfuso
 Lista ingredienti (come da etichettatura se presente o dati raccolti nel punto vendita): **tonno, riso, olio vegetale**
 Data di preparazione: 06-05-15 Data di scadenza:

CAMPIONE CONSEGNATO
 IL GIORNO 07/05/15
 ALLE ORE 8.10
 ALLA TEMPERATURA 51°C
 FIRMATO DEL TECNICO DI LABORATORIO [REDACTED]

Figura 18 Esempio di una scheda di campionamento

Tutti gli 86 campioni, provenienti dalla ristorazione etnica, sono stati analizzati mediante procedure accreditate e riferibili a metodiche ISO internazionalmente riconosciute. (Tabella 3).

DENOMINAZIONE DELLA PROVA	METODO DI PROVA
Larve di <i>Anisakis</i> (esame microscopico)	Circ Min San n. 10 11/03/92 + Reg CE 2074/2005 05/12/2005 GU CE L338 22/12/2005 All II Sez I
<i>Salmonella spp</i> (ELFA/esame colturale)	AFNOR BIO 12/32-10/11
<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Listeria spp</i> (esame colturale-UFC)	UNI EN ISO 11290-2: 2005
Coliformi, <i>Escherichia coli</i> beta-glucoronidasi positivi (esame colturale-UFC)	AOAC 991. 14 2002
Stafilococchi coagulasi positivi (<i>Staphylococcus aureus</i> e altre specie) (esame colturale-UFC)	ISO 6888-2: 1999/Amd 1:2003
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> (esame colturale)	ISO/TS 21872-1: 2007/Cor 1: 2008
<i>Bacillus cereus</i> (presunto) (esame colturale-UFC)	ISO 7932: 2004

Tabella 2 Elenco prove accreditate

In particolare sono stati eseguiti:

- 39 ricerche di larve di *Anisakis*;
- 12 ricerche di istamina;
- 86 ricerche di *Salmonella spp*;
- 86 conteggi di *Listeria monocytogenes*;
- 80 conteggi di *Escherichia coli* β -glucoronidasi positivi;
- 86 conteggi di Stafilococchi coagulasi positivi;
- 81 conteggi di *Bacillus cereus*;
- 69 ricerche di *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*.

3.2 Controllo visivo per la presenza di larve di *Anisakis*

Il primo approccio analitico prevede il “controllo visivo” per la presenza di larve di parassiti appartenenti alla famiglia *Anisakidae*, generi *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum*, *Phocascaris*, *Hysterothylacium*. Tale controllo non è un esame distruttivo, viene effettuato senza l’ausilio di sistemi di ingrandimento e in condizioni di buona illuminazione.

3.3 Determinazione della concentrazione di istamina

Per la rilevazione di istamina in campioni di tonno è stato utilizzato un metodo di screening che si avvale di kit commerciali in grado di dare risultati immediati (2 ore circa). La procedura di analisi del kit RIDASCREEN Histamine prevede 3 fasi consecutive tra cui la preparazione del campione, l’acilazione e il test ELISA.

Dieci grammi di campione sono stati omogeneizzati con acqua distillata. E’ stato quindi prelevato 1g di omogenato al quale sono stati aggiunti 9ml di acqua.

I campioni sono stati mescolati e centrifugati a 2.500 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente (20-25°C).

È stato prelevato 1ml di surnatante che è stato successivamente mescolato con 9ml di acqua.

La fase successiva prevede un’acilazione, necessaria per favorire il legame specifico tra l’antigene e l’anticorpo.

I kit ELISA contengono all’interno soluzioni standard e controlli necessari per la costruzione della retta di taratura. Tutti i campioni, gli standard e i controlli devono essere testati in doppio.

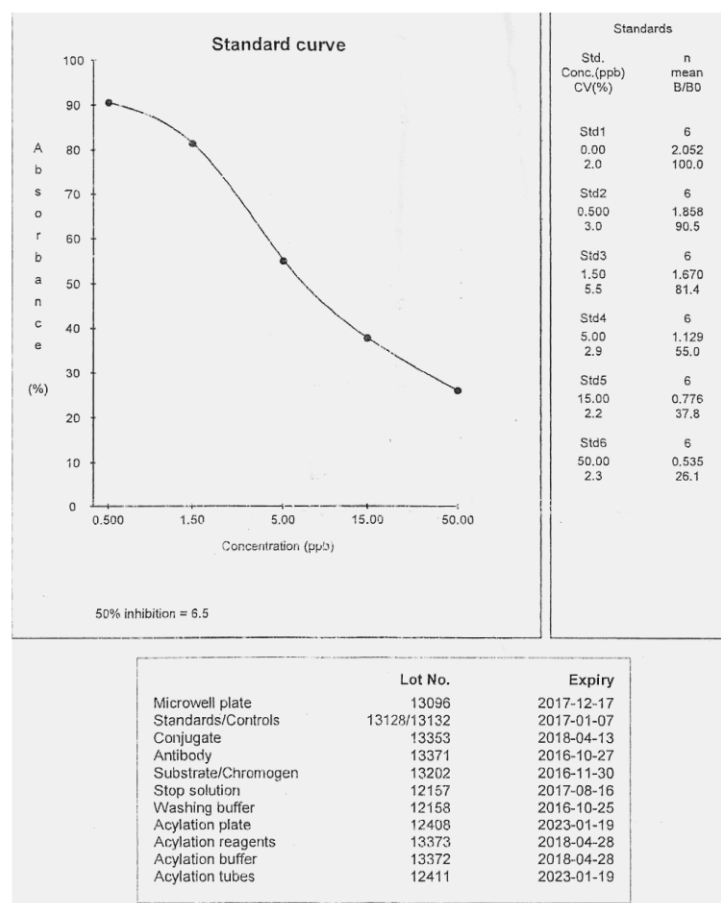


Figura 19 Retta di taratura del kit RIDASCREEN Histamine.

Per ciascun campione, standard e controllo sono stati prelevati 100µl e posti nei tubi per acilazione.

Sono stati aggiunti 25µl di acylation reagent e 200µl di acylation buffer.

I tubi sono stati mescolati e incubati a temperatura ambiente per 15 minuti.

Durante l'incubazione è stato preparato il Washing buffer 1X necessario per effettuare i lavaggi ed eliminare i legami aspecifici tra antigene e anticorpo.

Generalmente il Washing buffer è fornito dall'azienda produttrice in forma concentrata (50X) per cui è stato necessario diluirlo 50 volte considerando 1,5 ml per ogni campione.

Dopo 15 minuti sono stati 25µl di campione, standard o controllo all'interno dei pozzetti di una piastra ELISA.

Successivamente sono stati aggiunti 100µl di anti-histamine antibody solution.

La piastra è stata agitata delicatamente allo scopo di mescolare i reagenti ed è stata incubata 40 minuti a temperatura ambiente.

Dopo l'incubazione, è stato rimosso il liquido sbattendo 3 volte la piastra su carta assorbente e sono stati eseguiti 3 lavaggi consecutivi con 250µl di Washing buffer 1X.

Sono stati aggiunti e mescolati 100µl di coniugate solution.

La piastra è stata incubata per 20 minuti a temperatura ambiente.

È stato rimosso, nuovamente il liquido, sbattendo la piastra su carta assorbente e sono stati fatti 3 lavaggi consecutivi con 250µl di Washing buffer 1X.

Sono stati aggiunti 100µl di substrate/cromogeno solution e, dopo aver mescolato, la piastra è stata incubata per altri 15 minuti a temperatura ambiente e al buio.

Infine sono stati aggiunti 100µl di stop solution.

È stata letta l'assorbanza a 450nm entro 10 minuti dall'aggiunta della stop solution.

3.4 Analisi microbiologiche

3.4.1 *Salmonella spp.*

L'esame colturale (ELFA) per *Salmonella* prevede il prelievo, in condizioni di asepsi di 25g di campione trasferiti, successivamente, in un sacchetto presto-chiuso.

L'arricchimento è stato effettuato aggiungendo 225ml di acqua peptonata tamponata (BPW) allo scopo di ottenere una diluizione 1:10.

Il campione è stato omogeneizzato in Stomacher per circa 2 minuti.

A tale arricchimento è stato aggiunto un supplemento selettivo per *Salmonella spp.* contenente inibitori per la maggior parte dei gram positivi e per alcuni gram negativi.

L'aggiunta del supplemento segue la relazione:

$$x(ml) = \frac{\text{Volume di BPW}}{225 \text{ ml}}$$

Successivamente il sacchetto è stato prima agitato e poi incubato a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

Il giorno successivo sono stati trasferiti 2-3ml di brodo di arricchimento, per ciascun campione, in provette chiuse portate, successivamente, a $95-100^{\circ}\text{C}$ per 5 minuti.

Quando queste sono ormai fredde sono stati trasferiti 0,5ml di ogni campione all'interno di un pozzetto della cartuccia del VIDAS.

Il VIDAS è un sistema completamente automatizzato che mima la reazione immuno-enzimatica dei kit ELISA.

All'interno delle cartucce sono presenti anticorpi policlonali diretti contro *Salmonella spp.* e un substrato cromogeno (4-metil-umbelliferilfosfato). Qualora nel campione fossero

presenti antigeni riconducibili al microrganismo cercato si instaura una reazione altamente specifica che porta alla formazione di un composto fluorescente rilevato dallo strumento alla lunghezza d'onda di 450nm.

Tutte le fasi del procedimento sono gestite automaticamente dallo strumento e la durata del test è di circa 48 minuti.

Al termine dell'analisi viene stampato un foglio su cui sono riportati i riferimenti dei reagenti utilizzati, la data e l'ora, il riferimento indicativo del campione, il valore del test e l'interpretazione del risultato.

È un test qualitativo per valutare la presenza o assenza del patogeno in funzione di un valore soglia.

Il test è negativo se il valore rilevato dallo strumento è $< 0,25$; il test è positivo per valori $\geq 0,25$.

3.4.2 *Listeria monocytogenes*

L'arricchimento per la ricerca di *Listeria monocytogenes* è analogo a quello per *Salmonella spp.*

Sono stati prelevati 25g di campione, in condizioni di asepsi, ai quali sono stati aggiunti 225ml di acqua peptonata tamponata (BPW).

Il campione è stato omogeneizzato in Stomacher per circa 2 minuti e tale sospensione è stata lasciata a temperatura ambiente ($\cong 20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) per circa un'ora al fine di favorire la rivitalizzazione dei microrganismi stressati.

Trascorso il tempo necessario è stato prelevato, con una pipetta, 0,1ml di campione e trasferito su una piastra Petri, contenente il terreno solido selettivo Agar Listeria Ottaviani Agosti (ALOA).

L'inoculo è stato distribuito su tutta la piastra per spatolamento evitando di toccare i bordi della piastra stessa.

Per alcuni prodotti è necessario stimare piccoli numeri di *Listeria monocytogenes* per cui il limite di numerazione viene abbassato di un fattore 10 seminando 1ml di sospensione iniziale in una piastra Petri grande (140mm) o distribuendolo in 3 piastre Petri piccole (90mm).

Le piastre sono rimaste capovolte per circa 15 minuti in modo tale che l'inoculo fosse assorbito dal terreno.

Una volta che l'inoculo è stato assorbito le piastre sono state capovolte e incubate a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ore e per ulteriori 18-24 ore se non si osserva una crescita soddisfacente.

Su terreno ALOA le colonie riconducibili a *Listeria monocytogenes* sono verdi-blu e circondate da alone opaco.

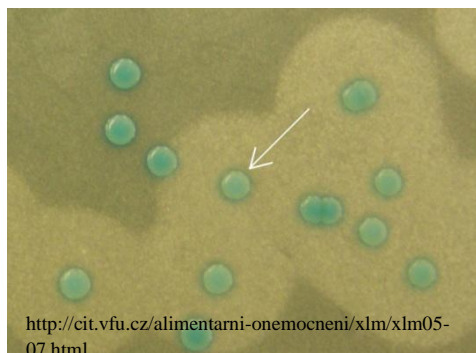


Figura 20 Colonie di *Listeria monocytogenes* su ALOA

3.4.3 *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi

Per il conteggio degli *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi si usano Petrifilm EC 3M, un sistema pronto per l'uso contenente il terreno di coltura Violet Red Bile (VRB), una sostanza gelificante, un indicatore della glucuronidasi (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucoronide) ed infine un indicatore al tetrazolio per facilitare il conteggio delle colonie.

Dieci grammi di campione sono stati prelevati, in condizioni di asepsi, e successivamente sono stati aggiunti 90ml di acqua peptonata (PTW).

I campioni sono stati omogeneizzati in Stomacher per circa 2 minuti e sono state eseguite diluizioni scalari 10^{-1} e 10^{-2} .

Dopo aver posto il Petrifilm su una superficie piana, con la pellicola verso l'alto, è stato prelevato 1ml di sospensione iniziale (10^{-1}) che è stato seminato al centro della piastra dopo aver sollevato la pellicola superiore.

La pellicola è stata appoggiata delicatamente evitando la formazione di bolle d'aria.

È stato prelevato, nuovamente, 1ml della sospensione iniziale e trasferito in una provetta contenente 9ml di PTW (10^{-2}).

La provetta è stata agitata su vortex ed è stato seminato 1ml di inoculo su Petrifilm seguendo le precedenti indicazioni.

È stato fatto un controllo negativo del terreno seminando 1ml di solo PTW.

I Petrifilm sono stati incubati a 35°C per 48 ore.

Dopo l'incubazione è possibile osservare colonie rosse circondate da gas riconducibili a coliformi; colonie blu circondate da gas sono riconducibili a *Escherichia coli*, in quanto dotati dell'enzima glucoronidasi.



Figura 21 Colonie di coliformi (rosse) ed *Escherichia coli* (blu) su Petrifilm

3.4.4 Stafilococchi coagulasi positivi

Il terreno differenziale per la ricerca degli stafilococchi è il Baird-Parker supplementato con *Rabbit Plasma Fibrinogen* (RPF).

Il supplemento, venduto in flaconi da 10 ml, contiene plasma di coniglio liofilizzato che deve essere ricostituito con 10 ml di soluzione fisiologica.

Il fibrinogeno permette di discriminare gli stafilococchi coagulasi positivi, potenzialmente patogeni, da stafilococchi patogeni opportunisti, in funzione del fatto che i primi, dotati dell'enzima coagulasi, crescono con colonie circondate da un alone di precipitazione.

La ricerca degli Stafilococchi coagulasi positivi prevede, in primo luogo, il prelievo di 10g di campione ai quali sono stati aggiunti 90ml di acqua peptonata (PTW).

Sono state eseguite diluizioni 10^{-1} e 10^{-2} prelevando 2ml dalla sospensione iniziale e seminando 1ml in una piastra Petri vuota e 1ml in una provetta contenente 9ml di PTW al fine di ottenere la diluizione 10^{-2} .

Dalla provetta è stato prelevato nuovamente 1 ml e trasferito in un'altra piastra Petri vuota.

La semina è fatta per inclusione mediante il trasferimento del terreno, precedentemente sciolto e supplementato, nelle piastre Petri fino a raggiungere uno spessore di circa 3mm.

L'inoculo è stato distribuito delicatamente e lasciato solidificare su una superficie orizzontale e fredda.

Anche in questo caso è opportuno preparare piastre per il controllo negativo contenenti solo terreno (BP), terreno con supplemento (BP+RPF) e terreno con supplemento e diluente (BP+RPF+PTW).

Dopo completa solidificazione le piastre sono state capovolte e incubate a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

Gli stafilococchi formano colonie nere o grigie circondate da un alone di precipitazione indicante l'attività della coagulasi.

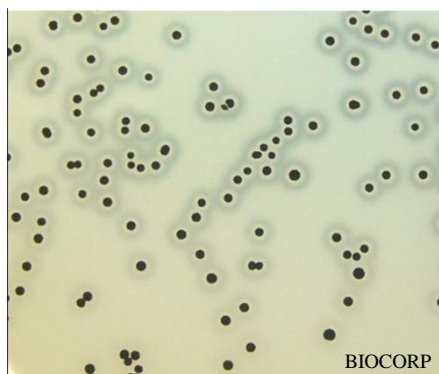


Figura 22 Colonie di Stafilococchi coagulasi positivi su BP

3.4.5 *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*

Per la ricerca di *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus* è previsto un esame culturale in quattro fasi successive.

In condizioni di asepsi 25g di campione sono stati prelevati e trasferiti in una busta pre-sto-chiuso alla quale sono stati aggiunti 225ml di acqua peptonata alcalina salina (ASPW).

I campioni sono stati omogeneizzati in Stomacher per 2 minuti e incubati a $41,5^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 6 ore.

Trascorse 6 ore di incubazione è stata eseguita la semina con un'ansa su due tipi di terreni solidi selettivi:

- TCBS (agar tiosolfato, citrato, bile e saccarosio);
- CHROMagar Vibrio.

Le piastre sono state incubate a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18 ore. Successivamente è stato effettuato l'arricchimento secondario.

È stata preparata una provetta per ogni campione contenente 10ml di ASPW all'interno della quale è stato trasferito 1ml di sospensione iniziale.

Le provette sono state, successivamente, incubate a $41^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18 ore.

Il mattino seguente è stata nuovamente effettuata la semina per striscio su TCBS e CHROMagar Vibrio; le piastre sono state incubate a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ore.

Trascorso il periodo di incubazione le piastre sono state esaminate per la presenza di colonie riconducibili a *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*.

Su piastre TCBS le colonie tipiche di:

- *Vibrio cholerae* sono lisce e gialle per la fermentazione del saccarosio;
- *Vibrio parahaemolyticus* sono lisce e verdi per la non fermentazione del saccarosio.

Su piastre CHROMagar Vibrio le colonie tipiche di:

- *Vibrio cholerae* sono blu-verdi o blu-turchese;
- *Vibrio parahaemolyticus* sono malva.

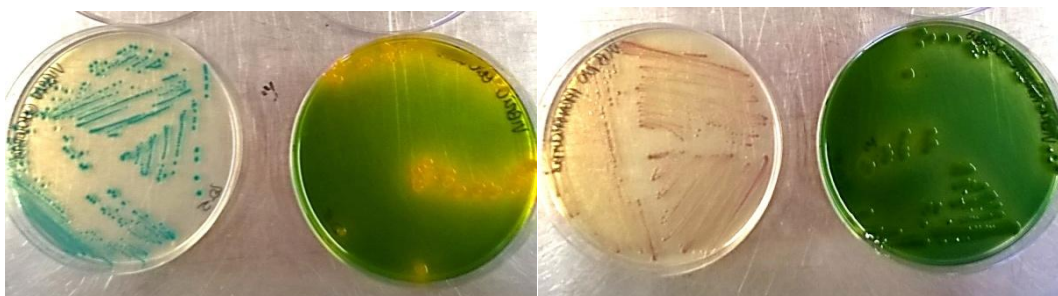


Figura 23 Colonie di *Vibrio cholerae* (a) e *Vibrio parahaemolyticus* (b) su TCBS e CHROMagar Vibrio

3.4.6 *Bacillus cereus*

Il terreno usato per la ricerca di *Bacillus cereus* è il terreno MYP supplementato con *Egg Yolk Emulsion* e l'antibiotico polimixina.

La procedura ISO 7932: 2004 prevede il prelievo, in asepsi, di 10g di campione ai quali sono stati aggiunti 90ml di acqua peptonata (PTW).

Sono state eseguite diluizioni scalari 10^{-1} e 10^{-2} ; è stato, successivamente, prelevato 0,1ml di ciascuna diluizione e trasferito su una piastra di MYP.

L'inoculo è stato distribuito mediante spatola sterile.

Lasciare le piastre capovolte per circa 15 minuti affinché il terreno potesse assorbire la sospensione le piastre sono state, dapprima, lasciate capovolte per circa 15 minuti e poi incubate a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore.

Su MYP le colonie di *Bacillus cereus* crescono rosa circondate da un alone di precipitazione.

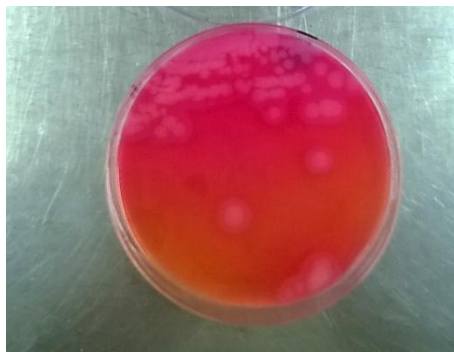


Figura 24 Colonie di *Bacillus cereus* su MYP

3.5 Conteggio delle colonie

Nel caso in cui le piastre abbiano mostrato presenza di colonie riconducibili ai microrganismi sopraccitati, è stato effettuato il conteggio attraverso la relazione:

$$N = \frac{\sum c}{V \times 1,1 \times d}$$

dove:

C= numero di colonie tipiche;

V= volume di campione inoculato;

d= diluizione.

4. Risultati e Discussione

Il crescente interesse nei confronti dei prodotti ittici da parte dei consumatori ha spinto il mercato europeo ad intensificare le importazioni da Paesi terzi, principalmente del Sud Est asiatico. Spesso, però, le buone pratiche di lavorazione ed i sistemi di tracciabilità di questi Paesi non si sono evoluti proporzionalmente al volume di prodotto commercializzato. Tale problema è aggravato dalle nuove abitudini alimentari, che hanno portato ad un consumo di pesce poco cotto o crudo, comportando una serie di rischi per la possibile presenza di patogeni. Nei paesi dove il consumo di pesce crudo è una tradizione, le tossinfezioni associate a questo alimento sono da imputarsi prevalentemente alla presenza di *Vibrio parahaemolyticus*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella*. Tali batteri patogeni possono essere presenti naturalmente nel mare e trasferirsi al pesce, crostacei e molluschi, provocando la possibile contaminazione dei prodotti Ready To Eat, oppure derivare da contaminazioni secondarie durante i processi di lavorazione e manipolazione. [NSW Food Authority, 2009]

Si deduce, quindi, che la preparazione di prodotti a base di pesce crudo richiede non solo elevati standard igienici, produttori responsabili e materie prime di alta qualità, sia in termini di freschezza che di provenienza, ma anche una buona conoscenza sia delle materie prime che delle pratiche di lavorazione. [Gianfaldoni and Guidi, 2008] Purtroppo il crescente interesse nei confronti della cucina giapponese e il giro di affari che lo circonda può attirare tutti coloro in cerca di facili guadagni e senza scrupoli nei confronti della salute del consumatore, o non consci dei rischi che si generano operando in settori di nicchia delicati, senza un'adeguata formazione. A tal proposito, da menzionare la crescente tendenza a convertire la cucina cinese in quella giapponese da parte di operatori del settore relativo alla ristorazione etnica, spesso privi di adeguate competenze, e, quindi, non in grado di garantire gli standard igienici necessari.

Alla luce di quanto detto, sorgono spontanei alcuni interrogativi sulla qualità dei preparati posti in commercio, la cui diffusione a livello mondiale sta rapidamente crescendo, in conseguenza all'aumento della loro popolarità, anche fra gli occidentali. In questo contesto, la necessità di monitorare le condizioni di igiene di tali prodotti ha trovato applicazione nel progetto in cui si inserisce questo lavoro di tesi, che ha permesso di effettuare una valutazione in tal senso, mediante analisi dei parametri microbiologici dettati

dai criteri di sicurezza alimentare e di igiene di processo previsti per legge, e tramite la ricerca di microrganismi potenzialmente patogeni nelle preparazioni alimentari a base di pesce crudo, pronte per il consumo. Mediante ricerca bibliografica sono stati quindi individuati i patogeni responsabili delle tossinfezioni o delle infestioni legate al consumo di questo tipo di alimento ed identificate le metodiche analitiche adeguate, già presenti tra quelle previste da ISO o accreditate nella rete degli IZZSS o ISS.

Di seguito si riportano i risultati relativi a ciascun patogeno ricercato (Tabella 3).

CODICE IZS	UC	DESCRIZIONE	Larve di Anisakis	Salmonella spp	Listeria monocytogenes (ufc/g)	E.coli B-glucuronidasi pos. (ufc/g)	Staf.coag. positivi (ufc/g)	Vibrio cholerae e V.parahaemolyticus	Bacillus cereus (ufc/g)
N.28680 PISA	1	Uramaki tonno	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Hosomaki salmone	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Nigiri tonno	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Nigiri salmone	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
N. 30737 PISA	1	Nigiri salmone		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Nigiri gambero		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Uramaki		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Hosomaki		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	5	Nigiri frittata		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²

N.35795 PISA	1	Uramaki salmone		Assente 25 g	<40 ufc/ml, sierotipo O:1	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Hosomaki		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Uramaki tonno		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	Microrg.< 4x10 ² ufc/ml
	4	Nigiri e Uramaki		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
N. 37045 PISA	1	Nigiri salmone		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Nigiri tonno		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Nigiri branzino		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Nigiri gambero		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
N. 39123 PISA	1	Nigiri orata		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Nigiri polpo		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Hosomaki anguilla		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Hosomaki granchio		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²

N.40366 PISA	1	Nigiri salmone e tonno		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Hosomaki salmone		Assente 25 g	<10	<10	4,5x10 ¹	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Uramaki surimi		Assente 25 g	<10	<10	5,5x10 ¹	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Uramaki salmone		Assente 25 g	<10	<10	4,5x10 ¹	Assente 25 g	<1X10 ²
N.41123 FIRENZE	1	Nigiri anguilla		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Nigiri salmone e uova di pesce		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Hosomaki salmon		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Hosomaki tonno		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
N.41124 FIRENZE	1	Nigiri cappasanta		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Hosomaki anguilla		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Hosomaki uova di pesce			<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Uramaki anguilla		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²

N.42816 PISA	1	Hosomaki uova di pesce		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Nigiri tonno,salmone, pesce bianco e gambero		Assente 25 g	<10	Quantità insufficiente	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Uramaki uova di lompo e salmone		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Nigiri orata		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
N.44815 PISA	1	Nigiri salmone		Assente 25 g	<10	<10	Microrg. < 40 ufc/ml	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Nigiri tonno		Assente 25 g	<10	<10	Quantità insufficiente	Quantità insufficiente	<1X10 ²
	3	Hosomaki tonno		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Hosomaki salmone e surimi		Assente 25 g	<10	<10	<1x10	Assente 25 g	<1X10 ²

N.49306 PISA	1	Hosomaki orata		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Hosomaki branzino		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Nigiri orata		Assente 25 g	<10	<10	<10	Quantità insufficiente	<1X10 ²
	4	Hosomaki uova di salmone		Assente 25 g	<10	<10	<10	Quantità insufficiente	<1X10 ²
N.51343 LIVORNO	1	Nigiri di orata		Assente 25 g	<10	<10	<10	Quantità insufficiente	<1X10 ²
	2	Nigiri di branzino		Assente 25 g	<10	<10	<10	Quantità insufficiente	<1X10 ²
	3	Nigiri di anguilla		Assente 25 g	<10	<10	<10	Quantità insufficiente	<1X10 ²
	4	Hosomaki uova di salmone		Assente 25 g	<10	<10	<10	Quantità insufficiente	<1X10 ²
N. 51345 LIVORNO	1	Nigiri orata		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Uramaki di orata e uova di pesce		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Uramaki anguilla conservata		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²

N.53108 PISA	1	Nigiri pesce spada	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Uramaki orata e uova di pesce	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Nigiri gamberi		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Uramaki e Hosomaki con tonno	Assenti	Assente 25 g	<10	Quantità insufficiente	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
N.54870 FIRENZE	1	Nigiri branzino	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Quantità insufficiente	<1X10 ²
	2	Hosomaki polpo	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Quantità insufficiente	Quantità insufficiente
	3	Nigiri orata	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Quantità insufficiente	<1X10 ²
	4	Hosomaki gambero	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Quantità insufficiente	<1X10 ²

N.54871 FIRENZE	1	Nigiri branzino	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Uramaki gambero e salmone	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Hosomaki tonno	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Hosomaki salmone	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
N.58306 LIVORNO	1	Hosomaki surimi e verdure		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Nigiri salmone, orata, tonno, gambero cotto	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Uramaki salmone	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Uramaki gambero	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	5	Hosomaki uova di pesce		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	6	Hosomaki salmone	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Quantità insufficiente	<1X10 ²

N.71502 VIAREGGIO	1	Nigiri gambero cotto	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Nigiri salmone e surimi granchio	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Nigiri tonno,salmone, pesce bianco e gambero	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Nigiri salmone	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
N.71503 VIAREGGIO	1	Nigiri branzino	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Hosomaki anguilla	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Hosomaki tonno	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Hosomaki anguilla	Assenti	Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
N.75655 PISA	1	Nigiri branzino	Assenti	Assente 25 g	<10	2.6x10 ²	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	2	Nigiri gambero		Assente 25 g	<10	3.03x10 ³	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Hosomaki salmone		Assente 25 g	<10	3.2x10 ²	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Uramaki branzino		Assente 25 g	<10	1.1x10 ³	<10	Assente 25 g	<1X10 ²

N.77520 FIRENZE	1	Hosomaki tonno		Assente 25 g	<10	<10	<10		<1X10 ²
	2	Nigiri branzino		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	3	Nigiri omelette		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²
	4	Hosomaki anguilla		Assente 25 g	<10	<10	<10	Assente 25 g	<1X10 ²

Tabella 3 Prodotti a base di Sushi campionati presso esercizi commerciali delle province di Pisa, Firenze Livorno e Lucca

4.1 *Anisakis*

L'esame ispettivo, previsto dalla Decisione della Commissione 93/140/CE del 19 gennaio 1993 per la valutazione della freschezza, non ha mai evidenziato la presenza di infestazione da *Anisakis* in forma larvale o adulta. La ricerca di questo nematode dovrebbe essere pratica routinaria nelle attività di controllo delle specialità di pesce crudo. Infatti, secondo l'FDA, le infestazioni da *Anisakis* sono destinate ad aumentare con la diffusione di sushi e sashimi bar. Il maggior numero di casi si registra, infatti, in Giappone, a causa della grande quantità di pesce crudo consumato. Tuttavia, anche negli Stati Uniti, sono stati documentati 50 casi di Anisakiasi in seguito ad ingestione di sushi o pesce crudo. [BBB - *Anisakis simplex* and related; <http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm070768.htm>]

In Italia, invece, nel 2006 gli Uffici Veterinari hanno segnalato molti casi di pesce infestato da *Anisakis*; tali infestazioni riguardavano soprattutto rana pescatrice e sgombrò importato da Regno Unito e Paesi Scandinavi. [ASL 13 (Regione Piemonte), 2007]

.

4.6 Istamina

In questo lavoro di ricerca, i livelli di istamina per le specie a carne rossa (tonno) non sono mai risultati superiori al limite definito dalla legge (200 mg/kg), in accordo con uno studio effettuato nel 2006 in Australia dove solo il 2,7% dei campioni presentava concentrazioni di istamina rilevabili. [NSW Food Authority, 2008] Quindi possiamo dedurre che durante la preparazione dei campioni analizzati sono state rispettate le norme di buona prassi igienica.

La formazione di istamina deriva dall'azione di specifici batteri che convertono l'amminoacido istidina, di cui il tessuto muscolare è ricco, nell'ammina biogena istamina, sostanza responsabile di una reazione simil-allergica con possibili risvolti devastanti nel consumatore. Nel 2005, ad esempio, è stato registrato un caso di intossicazione da sgombroidi in un uomo che aveva consumato, 30 minuti prima, un'insalata di tonno in un bar, rivelatasi in seguito contaminata da elevate concentrazioni di istamina, le cui concentrazioni massime sono stabilite dal Regolamento (CE) n. 2073/2005. Tale contaminazione non è stata riscontrata in campioni prelevati successivamente su confezioni integre presso la ditta fornitrice. [BEN, 2005] Si può dunque presupporre che l'istamina

non fosse preesistente all'interno del prodotto, ma che si sia generata in seguito, a causa di scarse condizioni igieniche durante la preparazione del pasto. [EFSA Journal 2015]

4.3 *Salmonella spp*

Nella nostra indagine, nessun campione ha rilevato la presenza di *Salmonella spp*. Sebbene *Salmonella spp*. sia un microrganismo generalmente associato a prodotti e carne avicola, è stato inserito tra i parametri microbiologici da ricercare a causa di un'epidemia registrata nel 2012 che ha colpito 425 persone nel distretto della Columbia (USA). Le specie responsabili sono state identificate come *Salmonella bereilly*, che ha colpito 410 persone, e *Salmonella nchanga* con 15 soggetti colpiti. Non è stato registrato alcun decesso, ma 55 persone sono state ospedalizzate. Tra le persone malate, 43 hanno risposto ad un questionario dettagliato circa il consumo di *sushi* ed è emerso che il 91% ha riferito di mangiare *sushi* contenente tonno, e l'84% ha riferito di mangiare *sushi* contenente tonno piccante. [CDC, 2012]

4.4 *Listeria monocytogenes*

Per parametri microbiologici per cui era prevista l'enumerazione, quale *Listeria monocytogenes*, i risultati hanno evidenziato l'assenza del germe o la sua presenza, in un *uramaki* di salmone, in concentrazioni inferiori a 100 UFC/g, identificato con il sierotipo O:1. Tali risultati risultano essere compatibili con quelli ottenuti nello studio del 2006 in Australia, dove, sebbene sia stata rilevata la presenza di *Listeria monocytogenes* nel 3% dei campioni, la sua concentrazione era sempre inferiore a quelli previsti per legge. [NSW Food Authority, 2008]

Da uno studio condotto sul *sushi* nel 2011, è emerso che basse concentrazioni iniziali di *Listeria monocytogenes* (10 UFC/g) possono essere contenute, in modo tale da non superare i limiti stabiliti dal regolamento comunitario [Regolamento (CE) 2073/2005] fino alla fine della shelf-life, attraverso una conservazione a temperature non superiori a 4°C per 3 giorni dalla data di produzione. [Liuzzo et al., 2011]



Figura 25 Campione 35795/1 Uramaki salmone

4.5 *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi

Dalla nostra ricerca, è emerso che tutti i campioni (2 *nigiri*, 1 *hosomaki* e 1 *uramaki*) provenienti dallo stesso punto di ristorazione etnica di Pisa presentassero cariche elevate di *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi. La rilevazione di concentrazioni elevate di *Escherichia coli*, o di coliformi fecali in generale, può indicare una scarsa igiene nell'ambiente di lavoro e dell'operatore che manipola il cibo. Tuttavia, la presenza di una vasta varietà di ingredienti nei campioni, come verdure o frutta, può influenzare la carica microbica del prodotto. [NSW Food Authority, 2008] Per questo motivo, buone pratiche di lavorazione sarebbero rappresentate dalla cura di ogni ingrediente, garantendone la qualità igienica, eventualmente effettuando lavaggi aggiuntivi con acqua potabile nel caso di vegetali, in modo da diminuirne il potenziale inquinante.



Figura 26 Campione 75655 (a) *Nigiri* branzino. (b) *Nigiri* gambero. (c) *Uramaki* branzino. (d) *Hosomaki* salmone

4.6 Stafilococchi coagulasi positivi

La presenza di Stafilococchi coagulasi positivi in concentrazioni elevate è indice di una scarsa igiene personale nella manipolazione degli alimenti e nel mantenimento delle basse temperature. Anche in questo caso, i risultati ottenuti sono paragonabili a quelli di precedenti studi, che, in rari casi (1 *hosomaki* e 2 *uramaki*), hanno rilevato concentrazioni inferiori ai limiti definiti per legge. [NSW Food Authority, 2008] Pertanto, i risultati relativi a questo microrganismo non danno adito a perplessità per quel che riguarda la cura personale degli operatori.



Figura 27 Campione 40366 (a) *Hosomaki* salmone. (b) *Uramaki* surimi. (c) *Uramaki* salmone

4.7 *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus*

L'esame colturale non ha mai rilevato la presenza del germe nei campioni analizzati. Sebbene non fosse prevista l'enumerazione per le due specie appartenenti al genere *Vibrio*, il suo rilevamento in campioni di sushi sarebbe stato un risultato marginale, in quanto si tratta di un microrganismo presente, normalmente, nell'ambiente marino con andamenti stagionali (più frequente nei mesi estivi) e con una elevate dose infettante (10^6 UFC/g); [NSW Food Authority, 2008]. Per questo motivo, si deduce che il controllo per limitare la proliferazione di tale microrganismo, e quindi la manifestazione della malattia, si basa sul mantenimento delle basse temperature.

4.8 *Bacillus cereus*

Da uno studio australiano è emerso che *Bacillus cereus* rappresenta un patogeno riscontrabile in preparati a base di pesce crudo, come il sushi, e che le concentrazioni di tale microrganismo possono superare il livello minimo necessario per scatenare patologie. L'unico campione risultato positivo dalla nostra indagine era un *uramaki* con all'interno tonno cotto. Tuttavia, le concentrazioni rilevate erano inferiori a 4×10^2 UFC/g, nettamente al di sotto di quella necessaria per manifestare i sintomi della malattia, che si stima essere

superiore a 10^5 UFC/g. [ICMSF, 1996] Probabilmente, tale riscontro è indice di un trattamento termico inadeguato che ha permesso alle spore di *Bacillus cereus* di germinare e proliferare nella fase in cui la temperatura del prodotto in raffreddamento era al di sotto dei 50°C [NSW Food Authority, 2008]



Figura 28 Campione 35795 Uramaki tonno cotto

4.9 Osservazioni supplementari

È stato interessante, inoltre, osservare la presenza di colonie blu-viola su CHROM-agar *Vibrio*. Si poteva apprezzare la crescita anche su Nutrien Agar con il 3% di NaCl.

Dai test di conferma è emerso che trattavasi di microrganismi gram negativi e ossidasi positivi. Allestendo una galleria API 20NE si è riusciti a risalire al genere *Aeromonas*, che comprende specie patogene per l'uomo, come *Aeromonas hydrophila*, e specie patogene opportuniste, come *Aeromonas caviae*. [James, Martin and David, 2009]



Figura 29 *Aeromonas* spp. gram stain.

Tali microrganismi non rappresentano, ad oggi, un criterio di sicurezza, ma sono responsabili, nell'uomo, di gastroenteriti e di forme setticemiche in soggetti immunocompromessi. [EFSA, 2015]

Uno studio del 2011 ha rilevato la presenza di *Aeromonas* spp. nel 70,3% di campioni di pesce *Ready To Eat*; in particolare il microrganismo è stato ritrovato nel 90,5% dei

campioni di sushi, nell'85,7% delle insalate di mare, nel 91,7% di surimi ed infine nel 75% di campioni di gamberetti sgusciati. [Di Pinto et al., 2011]

Precedenti studi ascrivono un'azione battericida e/o batteriostatica all'affumicamento e alla marinatura ed evidenziano, inoltre, che nei pesci c'è una minore incidenza di ceppi mobili di *Aeromonas spp.* rispetto ai molluschi eduli lamellibranchi. Si ricordi che la mobilità rappresenta un importante fattore di patogenicità. Da uno studio di Hudson e De Lacy (1991) è emerso che in tutti gli alimenti la presenza del microrganismo diminuisce in relazione ad un eventuale trattamento termico ed aumenta in seguito a manipolazione; la contaminazione del 47% di gamberetti cotti risultati positivi per *Aeromonas spp.*, di cui il 78% rappresentato da *Aeromonas hydrophila*, sarebbe stata quindi legata alle successive fasi di lavorazione.

Pur essendo un microrganismo mesofilo (optimum a 30-35°C), *Aeromonas hydrophila* si può sviluppare a temperature comprese tra 4°C [Tiecco, 1997] e 44°C. [Kirov, Hui and Hayward, 1993] Inoltre, tale microrganismo non presenta particolari esigenze nutrizionali; si sviluppa in un intervallo di pH tra 4 e 10 [Tiecco, 1997] con un optimum a pH 6 [Palumbo and Buchanan, 1988]. Tollera, però, anche pH alcalini. Non a caso, l'arricchimento prevede lo stesso terreno utilizzato per *Vibrio*, ovvero acqua peptonata alcalina. [Merino et al., 1995.]

Tramite tecniche molecolari, quali PCR, si possono mettere in evidenza i geni coinvolti nella produzione di emolisina A e citotossina responsabili della patogenicità del germe.

Nonostante, ad oggi, sia ampiamente documentato il ruolo di questo microrganismo nell'eziologia delle patologie gastrointestinali trasmesse con gli alimenti, la legislazione non prevede una normativa che ne regoli la presenza negli alimenti e nelle acque. Si può dedurre, quindi, che i microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas* possano essere inclusi in quella categoria di patogeni emergenti, ovvero quei microrganismi che prima non sembravano creare malattia nell'uomo.

Dai risultati ottenuti, nel loro complesso, è emerso che la materia prima utilizzata per la preparazione di sushi è di qualità soddisfacente e che il prodotto nella sua totalità è sicuro dal punto di vista microbiologico.

Uno studio analogo al nostro è stato condotto in Australia tra il 2006 e il 2007, dove 89 punti vendita di sushi al dettaglio sono stati sottoposti a campionamenti per valutare la conformità dei prodotti ai limiti microbiologici previsti per legge. Dallo studio è emerso che il 94,6% dei campioni di sushi è risultato soddisfacente. [NSW Food Authority, 2008]

Un altro studio, pubblicato nel 2008, ha invece messo a confronto la qualità microbiologica del sushi “fresco”, ovvero preparato al momento presso punti di ristorazione o sushi bar, con campioni prelevati presso alcuni supermercati tedeschi. È emerso che, dall’analisi di 250 campioni, la prevalenza di *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* era maggiore nei campioni freschi. *Salmonella* è stato trovato nell’1,6% dei campioni e *Listeria monocytogenes* è stato trovato nell’1,2% dei campioni. Da tale studio emerge che la qualità microbiologica di sushi prodotti a livello industriale è superiore a quella di sushi appena preparato, probabilmente a causa di una mancata formazione professionale dei cuochi o per una minore manipolazione da parte degli operatori nella produzione industriale. [Atanassova, Reich and Klein, 2008]

Al di là dei risultati ottenuti da indagini condotte da altri autori, resta comunque di fondamentale importanza effettuare monitoraggi periodici per verificare che le buone pratiche di lavorazione e di igiene siano poste in essere. Tale controllo assume particolare significato proprio nel peculiare contesto in cui vengono preparate le specialità a base di pesce crudo, spesso profondamente diverso in differenti regioni del mondo, anche in relazione alla realtà socio-economica locale e alla presenza di comunità etniche caratterizzate da un elevato turnover di operatori ed esercizi.

Le buone pratiche igieniche da parte degli operatori del settore alimentare rappresentano il modo migliore per garantire la sicurezza igienico-sanitaria di un prodotto e per preservare, allo stesso tempo, le notevoli proprietà organolettiche dell’alimento. Particolare attenzione deve essere posta al processo di refrigerazione, intesa come rispetto della catena del freddo nell’intera filiera produttiva, da attuare in maniera tempestiva e razionale, soprattutto nel caso di quei prodotti che vengono preparati con modalità che non prevedono la cottura della materia prima utilizzata.

Inoltre, da considerare altri aspetti associati in modo diretto od indiretto alle qualità igienico-sanitarie di un prodotto alimentare. Infatti, la condizione essenziale per un alimento è che esso venga prodotto, commercializzato, distribuito e stoccato sempre in condizioni igieniche ottimali, non solo per tutelare la salute del consumatore, ma anche perché gli episodi di malattia alimentare, eventualmente derivati da una cattiva gestione del prodotto, provocano danni e generano costi dovuti alle cure mediche immediate, le ore di lavoro o di studio perse, gli eventuali decessi, i problemi conseguenti all’assistenza familiare, la mancata fruizione del tempo libero, gli oneri a carico dell’industria o impresa alimentare (sospensione o chiusura attività), nonché i costi per il riacquisto della fiducia

del consumatore. In Europa o negli Stati Uniti, per ogni epidemia da *Salmonella spp.*, si stimano costi tra 60.000 e 20 milioni di dollari. Fortunatamente, sono poche le epidemie che risultano di particolare rilievo. [Zicari, 2001] Oltre alle implicazioni economiche menzionate, è opportuno ricordare anche la perdita di enormi quantità di alimenti e i costi per il ritiro dal mercato dei prodotti incriminati, le spese legali e l'estinzione delle sanzioni ricevute. Si deduce, quindi, che il modo migliore per evitare o limitare le epidemie veicolate da alimenti e le spese ad esse associate sia rappresentato dalla prevenzione.

Il lavoro svolto in questa tesi si può inserire nell'ottica di un'attività di prevenzione, che deve contemplare la verifica saltuaria delle condizioni di igiene dei prodotti e quelle operative sul territorio, relativamente agli esercizi implicati in questo tipo di preparazioni. I risultati di tali indagini possono essere d'ausilio per comprendere il livello di investimento, da parte delle istituzioni, richiesto per promuovere attività formativa. Infatti, anche se l'Europa ha un sistema normativo efficace e in grado di affrontare i possibili rischi associati a questo periodo, caratterizzato da una crescente globalizzazione, i controlli divengono più che mai necessari. Per garantire ciò, è fondamentale un'adeguata formazione a tutti i livelli, ovvero dei dipendenti, dei produttori, e dei consumatori. [Meer and Misner, 2000] Da questa prospettiva, si comprende chiaramente quanto suggerito dal teorico giapponese Ishikawa: "la qualità di un prodotto comincia con la formazione e termina con la formazione". [Ishikawa, 1985]. La collaborazione armoniosa tra il personale istruito in materia di igiene e il controllo senza compromessi dei punti critici del processo (scelta e conservazione delle materie prime, conservazione dei cibi) rappresentano una condizione importante per un'offerta ineccepibile dei prodotti.

Un punto chiave, relativo alle buone pratiche di igiene e alle buone pratiche di lavorazione, che devono essere appunto acquisite in un adeguato contesto formativo, riguarda alcuni aspetti contemplati nelle disposizioni emesse dal Reg. (CE) 1020/2008 e dal successivo Reg. (CE) 1276/2011, che hanno esteso l'obbligo del trattamento di bonifica oltre che ai titolari di stabilimenti riconosciuti, ricadenti cioè nel campo di applicazione del Reg. CE 853/2004, anche ai titolari di stabilimenti registrati (punti di ristorazione, mense aziendali, bar, ecc.).

La maggior parte dei punti di ristorazione, come anticipato precedentemente, è gestita da personale cinese con profonde difficoltà di comprensione della lingua; per tale motivo i corsi di formazioni dovrebbero essere sviluppati in maniera tale da essere facilmente comprensibili, soprattutto per quei concetti fondamentali come i parametri tempo/temperatura. Il ruolo e la preparazione degli Operatori del Settore Alimentare sono

fondamentali, in quanto ad essi spetta il dovere di tutelare la salute del consumatore anche inesperto ed indirizzarlo verso una vita qualitativamente migliore legata ad una sana e cosciente alimentazione.

Oltre alla formazione igienico sanitaria dell'alimentarista, di pari importanza è l'educazione del consumatore, la cui corretta formazione rappresenta un problema ancora irrisolto. Da un lato, egli è bersagliato da informazioni ingannevoli a scopo esclusivamente scandalistico; dall'altro non è ancora stata individuata la sede opportuna per una proficua educazione. Di fronte a notizie "killer", come vacca pazza, influenza aviaria, residui negli alimenti, ecc., l'utente è completamente disarmato e reagisce eliminando la "fonte del pericolo", provocando profondi danni al settore alimentare.

Si può, quindi, affermare che una corretta informazione è alla base di una sana e corretta alimentazione e di un consumo consapevole del prodotto, di qualsiasi natura esso sia. Non viene meno l'impegno da parte delle istituzioni che attraverso campagne pubblicitarie cercano di promuovere sia l'educazione del consumatore sia la formazione di operatori del settore alimentare in grado di garantire la qualità igienico sanitaria al prodotto.

A tal proposito, i giovani studenti rappresentano un'idonea popolazione bersaglio, in quanto consumatori del domani. Per tale motivo è fondamentale fornire loro, attraverso mezzi di comunicazione simpatici e divertenti, un'educazione sulla pulizia personale nella preparazione e manipolazione degli alimenti. Un esempio è rappresentato dal cortometraggio "*Evolve: a foody tale*", ad opera dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta. La realizzazione di un cartone animato, caratterizzato da un registro semplice, ha lo scopo di insegnare, ai "piccoli consumatori, le regole per un'alimentazione sicura e i riferimenti alla moda del "crudismo" sono un invito per i più giovani a fare una scelta alimentare sicura.

5. Conclusioni

In conclusione, si può affermare che la maggior parte dei campioni provenienti dagli esercizi di ristorazione e dalla Grande Distribuzione Organizzata sono risultati soddisfacenti per quanto riguarda i parametri microbiologici, la valutazione delle freschezza e la presenza di ammine biogene (istamina).

Gli unici elementi da segnalare sono rappresentati dalla presenza di stafilococchi coagulasi positivi, *Escherichia coli* β -glucoronidasi positivi, considerati indicatori di igiene di processo o di trattamenti termici inadeguati, e *Bacillus cereus* e *Listeria monocytogenes*, in concentrazioni sempre inferiori ai limiti necessari per scatenare un episodio infettivo. Per questo motivo, anche se i risultati ottenuti indicano, nel complesso, che le condizioni delle materie prime e quelle di lavoro sono soddisfacenti, non si deve escludere un margine di miglioramento relativamente alle condizioni igieniche durante le fasi di lavorazione, perseguibile dai responsabili di alcuni esercizi.

In questo contesto, la prevenzione costituisce un requisito indispensabile del sistema produttivo, attuando strategie che coinvolgano tutti coloro che si occupano di produzione, trasformazione, distribuzione e somministrazione del cibo. Fondamentale risulta il ruolo delle istituzioni, che devono intervenire a diversi livelli (centrale, regionale e locale) nel monitoraggio, vigilanza e formazione in questo settore, anche promuovendo attività come quella riguardante questo lavoro di tesi, che permettono di acquisire informazioni sulle condizioni operative delle imprese inserite in comparti particolarmente a rischio, come quello relativo alla produzione di specialità a base di pesce crudo.

Bibliografia

AA.VV. a cura di Colavita G., 2008. Igiene e tecnologie degli alimenti di origine animale. PVI – Milano

Andreis G., Ottaviani F., 2002. Manuale della sicurezza microbiologica degli alimenti e delle acque. Oxoid, Arese (MI)

Armani A., Castigliego L. and Guidi A., 2012. Fish fraud: The DNA challenge. CAB Animal Science Reviews, 7, 227-239

ASL 13 (Regione Piemonte), 2007. IL PESCE CRUDO E L'ANISAKIS. Articolo n. 17 del 7 novembre 2007

Atanassova V., Reich F. and Klein G., 2008. Microbiological Quality of Sushi from Sushi Bars and Retailers. Journal of Food Protection, Volume 71, Number 4, April 2008, pp. 860-864(5)

Audicana M.T., Ansotegui I.J., de Corres L.F., Kennedy M.W., 2002. Anisakis simplex: dangerous – dead and alive?. TRENDS in Parasitology. 18(1), 20-25

Autilio E., 2013. Fugu: il veleno che conquista i buongustai. LA STAMPA MARE.<http://www.lastampa.it/2013/08/21/societa/mare/focus/fugu-il-veleno-che-conquista-i-buongustai-w5GkpsR4J3f4e6gtBxnZvI/pagina.html>

BBB - Anisakis simplex and related;
<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/ucm070768.htm>

BEN (Bollettino Epidemiologico Nazionale), 2005. Intossicazione alimentare da istamina a seguito di consumo di pesce fresco e inscatolato Notiziario ISS .Vol. 18, n. 11

Borrello S., 1998. Il ruolo del veterinario nel delicato settore della ristorazione professionale. La ristorazione collettiva, pp. 29-34

CAC (Codex Alimentarius Commission), 1999. Principles and guidelines for the conduct of Microbiological Risk Assessment. FoodHygiene Series. CAC/GL 30

Castellani G., 1998. Evoluzione della qualità sanitaria e delle regolamentazioni nella produzione dei piatti per la ristorazione. La ristorazione collettiva, pp. 23-27

CDC (Centers for Disease Control and Prevention), 2012. Multistate Outbreak of Salmonella Bareilly and Salmonella Nchanga Infections Associated with a Raw Scraped Ground Tuna Product (Final Update). USA

Cedroni M., 2001. Susci& Sushi, Bibliotheca culinaria, Lodi

Clonan A., Holdsworth M., Swift J.A., Leibovici D. and Wilson P., 2012. The dilemma of healthy eating and environmental sustainability: the case of fish. Public healthnutrition, 15(02), 277-284

Colasanto C., 2010. "Dal sushi alle ostriche: pesce crudo senza rischi". Ecco cosa sapere salute 24, martedì 4 maggio 2010

Cozzi L., Ciccaglioni G., 2004. Vibroni patogeni veicolati dai prodotti della pesca. Atti del Workshop di aggiornamento su problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici, Istituto Superiore di Sanità Roma, 24-25 maggio 2004 <http://www.iss.it/binary/publ/publi/05-24.1129716985.pdf>

Croci L., Serratore P., Cozzi L., Stacchini A., Milandri S., Suffredini E., Toti L., 2001. Detection of Vibrionaceae in mussels and their sea water growing area. Lett ApplMicrobiol, 32:57-61

Dalgaard P., Emborg J., Kjolby A., Sorensen N.D. and Ballin N.Z., 2008. Histamine and biogenic amines: formation and importance in seafood. Improving Seafood Products for the consumer, 292-324

Dalgaard P., Madsen H.L., Samieian N. and Emborg J., 2006. Biogenic amine formation and microbial spoilage in chilled garfish (*Belone belone belone*)-effect of modified atmosphere packaging and previous frozen storage. Journal of Applied Microbiology, 101, 80-95

De Carneri I. a cura di Genchi C., Pozio E., 2003. Parassitologia generale e umana. CEA – Rozzano (MI)

Del Bono G.C., Renon P., 2001. Igiene ed educazione alimentare, cp 1.3, cp. 1.5, cp. 2.3, cp. 2.6, cp. 3.2

Di Pinto A., Terio V., Di Pinto P., Tantillo G., 2011. Detection of potentially pathogenic *Aeromonas* isolates from ready-to-eat seafood products by PCR analysis. International Journal of Food Science & Technology

Dinucci M., Pellegrini C., 2010. Geografia del ventunesimo secolo. Zanichelli

Domenech-Sanchez A., Laso E., Perez M.J. and Berrocal C.I., 2011. Emetic disease caused by *Bacillus cereus* after consumption of tuna fish in a beach club. Foodborne Pathogens and Disease, 8, 835-837

EFSA (European Food Safety Authority), 2015. Scientific and technical assistance on the evaluation of the temperature to be applied to pre-packed fishery products at retail level. EFSA Journal 2015;13(7):4162, 48 pp

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union Summer report on

trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. EFSA Journal 2015;13(1):3991, 162pp.

Emborg J., Dalgaard P. and Ahrens P., 2006. *Morganella psychotolerans* sp nov., a histamine producing bacterium isolated from various seafoods. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 56, 2473-2479

Ester P., 1999. Mediterraneo invaso dai pesce tropicali. Le specie "immigrate" sono 110: i cambiamenti colpa dei mutamenti del clima sempre più caldo. Corriere della Sera. 7 Maggio 1999

EU (European Union), 2014. Facts and figures on the Common Fisheries Policy-Basic statistical data-2014 Edition. Luxembourg: Publications Office of the European Union 2014, 44p. ISBN 978-92-79-34192-2

EUMOFA, 2013. European Market Observatory for Fisheries and Aquaculture Products

Fazii P., 2010. Descrizione di 13 casi di Anisakiasi in Abruzzo. Patol. Clin 2010, 43:44.60° Congresso Nazionale A.I.Pa.C.Me.M.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture

Giaccone V., 2001. Il confezionamento dei prodotti ittici sotto vuoto e in atmosfera protettiva, atti convegno "Metodologie avanzate di ricerca e tematiche strategiche per lo sviluppo del settore agroalimentare" tenutosi a Mosciano Stazione (TE) il 6 e 7 dicembre 2000, Media edizioni, Selva Piana di Mosciano S.A. (TE), pp. 20-23

Gianfaldoni D. and Guidi A., 2008. What kind of formation in the multiethnic culture of the European Union of the third millennium?. Springer Science + Business Media B.V.

Horibe Y., 2003. Japanese don't know anything about Sushi (Nihonjinwa Sushi no Koto o Nanimō Shiranai), Utokushi Nihon no Saihatsuden Suru Kai. Gakushu Kenkyusha: Tokyo, 9–48 (In Japanese)

Hudson J.A. and De Lacy K.M., 1991. Incidence of motile *Aeromonas* in New Zealand retail foods. J. Food Prot. 54; 696-699

Huss H.H., Reilly A. and Ben Embarek P.K., 2000. Prevention and control of hazards in seafood. Food Control, 11, 149-156

ICMSF, 1996. Microorganisms in Food 5. Microbiological specifications of food pathogens. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. Blackie Academic & Professional, London

Ishikawa K., 1985. What is Total Quality Control. The Japanese Way. Prentice-Hall, Englewood Cliffs

Ismea, 2011. Le importazioni dei prodotti di acquacoltura nell'UE, dal convegno su "Qualità e sicurezza dei prodotti dell'acquacoltura: regolamenti, controlli e flussi commerciali". Roma 24 Ottobre 2011

James M. Jay, Martin J. Loessner, David A. Golden, 2009. Microbiologia degli alimenti. Springer-Verlag Italia

Käferstein F.K., Motarjemi Y., Bettcher D.W., 1997. Foodborne disease control: a transnational challenge. Emerging infectious diseases. 3(4), 503

Kanki M., Yoda T., Ishibashi M. and Tsukamoto T., 2004. *Photobacterium phosphoreum* caused a histamine fish poisoning incident. International Journal of Food Microbiology, 92, 79-87

Kirov S.M., Hui D.S. and Hayward L.J., 1993. Milk as a potential source of *Aeromonas* gastrointestinal infection. J. Food Prot. 56; 306-312

Kitamura, M., Omori, M., 2010. Synopsis of edible jellyfishes collected from Southeast Asia, with notes on jellyfish fisheries. Plankton Benthos Res 5(3): 106-118, 2010

Kobayashi, A., Tsuji M., and Wilbur D.L., 1985. Probable pulmonary anisakiasis accompanying pleural effusion. Am. J. Trop. Med. Hyg. 34, pp. 310-313

Koie M., Berland B., Burt M. D. B., 1995. Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakiidae). National Research Council of Canada, Ottawa, ON, CANADA, 260 pp.

Landi S., 2010. L'avanzata del sushi e dei ristoranti etnici. Corriere della Sera 8 marzo 2010

Levsen A., Lunestad, B.T., 2010. *Anisakis* third stage larvae in Norwegian spring spawning herring (*Clupea harengus* L.), with emphasis on larval distribution in the flesh. Vet. Parasitol. 4; 171 (3-4), pp. 247-253

Lipp E.K., Rose J.B., 1997. The role of seafood in foodborne diseases in the United States of America. Rev Sci Tech; 16:620-40

Liston J., 1980. Microbiology in fishery science. In "Advances in Fish Science and Technology". Ed. J.J. Connel, LTD Farnham, Surrey, England

Liuzzo G., Bonilauri P., Leonelli R., Serraino A., Bentley S., 2011. Considerazioni preliminari sul sushi quale alimento potenzialmente pericoloso. A.U.S.L. Modena, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Sez.

Reggio Emilia, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale-
Università di Bologna, Dipartimento di Salute Animale- Università di Parma

Manzoni P., Biancelli F., Civera T., Bottero M.T., 1998. Riscontro di frodi commerciali (ART. 515 C.P.) nella vendita e somministrazione di filetti di pesce: esperienze personali. *La ristorazione collettiva*, 337,338

Marko P.B., Lee S.C., Rice A.M., Gramling J.M., Fitzhenry T.M., McAlister J.S., Harper G.R. and Moran A.L., 2004. Mislabelling of a depleted reef fish. *Nature* 430(6997), 309-310

Masotti G., Amadei P., Lanni L., 2010. Pesce crudo: condizioni igieniche operative e strutturali nei ristoranti giapponesi. *S.I.Ve.M.P.* , Luglio 2010, pp. 63

Meer R.R. and Misner S.L., 2000. Food safety Knowledge and behavior of expanded food and nutrition education program participants in Arizona. *Journal of Food Protection*, 63(12), 1725–1731

Merino S., Rubires X., Knochel S. and Tomas J.M., 1995. Emerging pathogens: *Aeromonas* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 28; 157-168

Miller D.D. and Mariani S., 2010. Smoke, mirrors, and mislabeled cod: poor transparency in the European seafood industry. *Frontiers in Ecology and the Environment* 8, 517-521

MIPAAF (Ministero delle Politiche Agricole, Alimentari e Forestali), 2009. Attività di pesca. Manuale di buona prassi igienica per la produzione primaria

Mossel D.A.A., 1982. *Microbiology of Food*. Ed. The University of Utrecht

Murray P.R., 1995. *Manual of clinical microbiology*. Washington (DC): ASM Press

Nishikawa, J., Thu, H.H., Ha, T.M., Thu, P.T., 2008. Jellyfish fisheries in northern Vietnam. *Plankton Benthos Res* 3:227-234

Nogara M., Rossari C., Stella S., Cozzi M., Cantoni C., 2004. Valutazione microbiologica del pesce crudo utilizzato per la preparazione del sushi. *Il Pesce*, N.5

NSW Food Authority, 2008. Report on food handling practices and microbiological quality of sushi in Australia

NSW Food Authority. Microbiological quality of sushi, 2009. Snapshot survey on the microbiological quality of sushi sold in NSW. pp. 9

Oliver J.D., Kaper J.B., Doyle M.P., Beuchat L.R., Montville T.J., 1997. *Vibrio* species. *Food Microbiology. Fundamentals and frontiers*. Washington (DC): ASM Press. p. 228-64

Orban E., 2007. Qualità, igiene e sicurezza nella filiera ittica. <https://www.politicheagricole.it/flex/files/b/f/e/D.92aac5bfec03a48474c3/cap19.pdf>

Ozogul F. and Ozogul Y., 2006. Biogenic amine content and biogenic amine quality indices of sardines (*Sardinapilchardus*) stored in modified atmosphere packaging and vacuum packaging. *Food Chemistry*, 99, 574-578

Pagliarino E., 2013. Sano come un pesce. Ricerca e innovazione lungo la filiera acquacoltura-ristorazione scolastica. FrancoAngeli s.r.l., Milano, Italy

Palumbo S.A. and Buchanan R.L., 1988. Factors affecting growth or serviva of *Aeromonashydrophila* in foods. *J. FoodSafety*. 9; 37-51

Poli G. and Cocilovo A. (2006). *Microbiologia e immunologia veterinaria*. UTET – Torino;

Pozio E., 2004. Zoonosi parassitarie trasmesse dai prodotti ittici. Atti del Workshop di aggiornamento su problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici, Istituto Superiore di Sanità Roma, 24-25 maggio 2004

RASFF for safer food, 2015. The Rapid Alert System for Food and Feed - 2014 annual report. European Commission - Health and Food Safety

Regolamento (CE) n. 1099/2009 del Consiglio del 24 settembre 2009 relativo alla protezione degli animali durante l'abbattimento. G.U. dell'Unione Europea n. L303/1 del 18 novembre 2009

Regolamento (CE) N. 1020/2008 della Commissione del 17 ottobre 2008 che modifica gli allegati II e III del regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale e il regolamento (CE) n. 2076/2005 per quanto riguarda la marchiatura d'identificazione, il latte crudo e i prodotti lattiero-caseari, le uova e gli ovo prodotti e taluni prodotti della pesca. G. U. della U. E. L 277/8, del 18 ottobre 2008

Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare, G. U. delle Comunità Europee n. L 31/1 del 1 febbraio 2002

Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione Europea del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, G.U. dell'Unione Europea L338/1 del 22 Dicembre 2005

Regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 "sull'igiene dei prodotti alimentari". G.U. dell'Unione europea n. L139/1 del 30 aprile 2004

Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale, G. U. dell'Unione europea L 139 del 30 aprile 2004

Regolamento (UE) n. 1169/2011 del Parlamento europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011 “Relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, che modifica i regolamenti (CE) n. 1924/2006 e (CE) n. 1925/2006 del Parlamento europeo e del 69 Consiglio e abroga la direttiva 87/250/CEE della Commissione, la direttiva 90/496/CEE del Consiglio, la direttiva 1999/10/CE della Commissione, la direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, le direttive 2002/67/CE e 2008/5/CE della Commissione e il regolamento (CE) n. 608/2004 della Commissione”, che ridefinisce la normativa relativa all’etichettatura dei prodotti alimentari

Regolamento (UE) n. 1276/2011 della Commissione dell'8 dicembre 2011 che modifica l'allegato III del regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio relativamente al trattamento per l'uccisione di parassiti vitali in prodotti della pesca destinati al consumo umano, G.U. dell'Unione europea L 327/39 del 9 dicembre 2011

Regolamento (UE) n. 16/2011 della Commissione del 10 Gennaio 2011 recante disposizioni di applicazione relative al sistema di allarme rapido per gli alimenti ed i mangimi. G.U. dell'Unione Europea n. L6 del 11 Gennaio 2011

Reilly PJA and Twiddy DR, 1992. Salmonella and Vibrio cholerae in brackishwater cultured tropical prawns. International Journal of Food Microbiology, 16, 293-301

Ring C.H., 1998. La tutela del consumatore nell'ambito della ristorazione in Germania. La ristorazione collettiva, pp 35-39

Ruiz-Capillas C. and Moral A., 2004. Free amino acids and biogenic amines in red and white muscle of tuna stored in controlled atmosphere. *Amino Acids*, 26, 125-132

Rushovich A.M., Randall E.L., Caprini J.A., Westenfelder G.O., 1983. Omentalanisakiasis: a rare mimic of acute appendicitis. *Am. J. Clin. Pathol.* 80, pp. 517-520

Saheki K., Kobayashi S. and Kawanishi T., 1989. Salmonella contamination of eel culture ponds. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 55, 675-679

Squarcione S., 2007. Gestione del rischio associato alle fioriture di *Ostreopsis ovata* nelle coste italiane Ministero della Salute. Dipartimento della Prevenzione e della Comunicazione Direzione Generale della Prevenzione Sanitaria Ufficio IV

Stiles M.L., Lahr H., Lahey W., Shaftel E., Bethel D., Falls J. and Hirshfiel M.S., 2011. Bait and switch: how seafood fraud hurts our ocean, our wallets and our health. *Oceana*

Takei H., Powell S.Z., 2007. "Intestinal anisakidosis (anisakiosis)" *Ann. Diagn. Pathol.* 11, pp. 350-352

Tepedino V., Ferri M., 2013. Sono arrivati pesci palla velenosi nel Mediterraneo: quali rischi per i consumatori?. *Redazione Il Fatto Alimentare*, 15 novembre 2013

Tiecco G., 1997. *Igiene e tecnologia alimentare*, ed. Agricole. Bologna. 674-676

Tiecco G., 2000. *Microbiologia degli alimenti di origine animale*. Calderini Edagricole. Bologna, pp. 82-88

Tiecco G., 2001. *Igiene e tecnologia alimentare*. CALDERINI ed. agricole – Bologna

Tolli R., Greco S., Di Giampietro G., Marrocco M.G., Vita S., Bilei S., 2012. Enterobatteri patogeni: Rapporto regionale sulla sorveglianza di laboratorio, pp. 9

Toti L., 2004. Rischi igienico-sanitari connessi al consumo dei prodotti della pesca. Atti del Workshop di aggiornamento su problematiche emergenti nel settore dei prodotti ittici, Istituto Superiore di Sanità Roma, 24-25 maggio 2004 <http://www.iss.it/binary/publ/publi/05-24.1129716985.pdf>

Urquhart G. M., 2004. Parassitologia veterinaria. UTET – Torino

Vazquez-Sanchez D., Lopez-Cabo M., Saa.Ibusquiza P. and Rodriguez-Herrera J.J., 2012. Incidence and characterization of *Staphylococcus aureus* in fishery products marketed in Galicia (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 157, 286-296

Vizzani A. and Cenci Goga B.T., 2005. Aspetti igienico-sanitari di alimenti non convenzionali. Atti XVConvegno AIVI, Tirrenia, 45–50

West P.A., 1989. The human pathogenic *Vibrios*. A public health update with environmental perspectives. *Epidemiol Infect*;103:1-34

Who, 2014. Proportion of population using improbe sanitation facilities http://gamapserv.who.int/gho/interactive_charts/mdg7/atlas.html?indicator=i5&date=2012

Wikipedia, 2015. List of Sushi and Sashimi ingredients

Wyatt L.E., Nickelson R. and Vanderzant C., 1979. Occurrence and control of *Salmonella* in freshwater catfish. *Journal of Food Science*, 44, 1067-1073

Yokogawa M., and Yoshimura H., 1967. Clinicopathologic studies on larval anisakiasis in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16, pp. 723-728

Zicari G. 2001. Contaminazione biologica-Epidemiologia. L'igiene degli alimenti. Microrganismi, fitofarmaci ed organismi modificati geneticamente. Esselibri-Simone.

